

(19) Korean Industrial Property Office(KR)

(12) Public Patent Official Report(A)

(51) Int.CI.⁷

A61K 35/78

(11) Publication Number 10-2004-0026175

(43) Date of publication of specification March 30, 2004

(21) Application number 10-2002-0057535

(22) Date of filing September 23, 2002

(71) Applicant Academic juridical person Kyunghee University
1 Seocheon-myon, Kihung-up, Yongin-si, Kyeonggi-do
Shim,In-sop
401-201, Saepyeolmaulsamu Apt. Bungdang-dong, Bungdang-gu,
Sungnam-si, Kyeonggi-do

(72) Inventor Shim,In-sop
401-201, Saepyeolmaulsamu Apt. Bungdang-dong, Bungdang-gu,
Sungnam-si, Kyeonggi-do
Hwang,Hye-jeong

138, Jinjungri,Sanyang-myon, Moongyung-si, Kyeongsangbukdo
Ham,Dae-hyeon

101-704, Dongagreen Apt. Sungsu 1 ga 2 dong,
Sungdonggu, Seoul

Lim,Sabina
1702, Dusan Apt.No 115, 10 Sukkwandong, Sungbuk-gu, Seoul
Lee,Hye-jeong

103-701,Dongmun Apt. Pungdukchunri, Sujiup,
Yongin-si, Kyeonggido

Lee,Bae-hwan
1407,Dongnipmunsamho Apt. No108, 100 Yongchundong
Kim,Chang-ju

249-5, Shinyongdong, Chongnogu, Seoul

Han,Seung-mu
804, Kumhobestvil No.252, Sanghyunmaul,
Sujiup, Yongin-si, Kyeonggido
Park,Hi-jun

1102, Samsungremian Apt.No 101, Imundong,
Tongdaemungu, Seoul
Lee, Ji-suk
403, Saejong Apt.No 643, 1145 Sanbondong, Gunposi, Kyeonggido
Kim, Gyeong-a
1003, Chunggu Apt.No.104, 243-23, Daeyeondong, Namgu, Pusan

(74) Deputy Kim, eun-gu

Claim for examination:

(54) Analysis method of analgesics effect of *Nelumbo nucifera* gaertner and *Nelumbo nucifera* gaertner analgesics preparation

Summary

This invention is about the analysis method of analgesics effect of *Nelumbo nucifera* gaertner by using neuropathic pain model as a behavioristic index and the animal model using formalin test, and the *Nelumbo nucifera* gaertner analgesics preparation containing, as an active ingredient, *Nelumbo nucifera* gaertner of which analgesics effect was analyzed by using analysis method of analgesics effect, and pain relieving effects can be expected for not only pain patients who feel pain due to the nerve damage but also the general pain disease through the use of the above-mentioned medicine.

Representative figure

Figure 3

Detailed statement

Brief explanation of the figures

Figure 1a and 1b are a photograph and a concept drawing of the pain part in the neuropathic pain model according to this invention

Figure 2 is a graph explaining control effect on mechanical allodynia of *Nelumbo nucifera* gaertner according to this invention

Figure 3 is a graph explaining control effect on cold allodynia of *Nelumbo nucifera gaertner* according to this invention

Figure 4a is a photograph of the device for formalin test used in this invention

Figure 4b and 4c are animals' action photographs in formalin test

Figure 5 is a graph explaining pain control effect of *Nelumbo nucifera gaertner* in formalin test of *Nelumbo nucifera gaertner* according to this invention

Detailed explanation of the invention

The purpose of invention

Technology that invention belongs to and former technology of the field

This invention is about the analysis method of analgesics effect of *Nelumbo nucifera gaertner* by using neuropathic pain model as a behavioristic index and the animal model using formalin test, and the *Nelumbo nucifera gaertner* analgesics preparation containing, as an active ingredient, *Nelumbo nucifera gaertner* of which analgesics effect was analyzed by using analysis method of analgesics effect.

Pain, especially chronic pain is terribly unbearable for man, and patients suffering from chronic pain have difficulties in living normal lives. The patients ask for help, appealing for the pain because they want to be liberated from such pains, and constant efforts have been made to control the pain in the medical world. The Chinese medicine has been used for a long period in the tradition Chinese medical science, and has shown excellent therapeutic effects to the pain. Recently the necessity for the research has been suggested how various materials of Chinese medicine have influence on pain control and what operator is mediated.

Examining the report concerning pain control effect with the existing material of Chinese medicine, the effect of acarid liquid for acupuncture was analyzed to act on the rats induced by CFA(complete Freund's adjuvant) arthritis to control inflammation, to give rise to the decrease of significance in the total number of the leukocyte that showed

the inflammatory condition, to heal inflammation caused by arthritis, acting on immunity Globulin and albumin of the serum to control necrosis of muscular organization in histology. And, the analgesics effect of dandelion is of significance as the result of measuring the frequency of Writhing syndrome by using acetic acid. And, the analgesics effect of medical decoction for cough and power which was made from arrowroot as the main material with the method of using acetic acid and thick paper pressurization was admitted.

While, There were few reports concerning pain control in the pain model though the Antioxidative effect (Ushimaru 2001), repression action, and the effect of muscular slack(Mukherjee, 1996) etc. were reported by using *Nelumbo nucifera gaertner* in former research.

Technical problem to be accomplished by this invention

This invention is to solve the necessity and the problem of the prior technology like the above-mentioned, of which purpose is to provide the neuropathic pain model as a behavioristic index and the animal model using formalin test for analysis of analgesics effect of *Nelumbo nucifera gaertner*.

And, the purpose of this invention is to analyze analgesics effect of *Nelumbo nucifera gaertner* by using the neuropathic pain model as a behavioristic index and the animal model using formalin test.

The constitution and action of this invention

For this purpose, this invention provides analysis method of analgesics effect of *Nelumbo nucifera gaertner* to analyze analgesics effect of *Nelumbo nucifera gaertner* by executing the inspection of allodynia, after making the animal model to induce neuropathic pain syndrome through ligature and cut of tibial nerve and sural nerve of the laboratory animal.

Above-mentioned inspection of allodynia may be one of mechanical allodynia inspection by von-Frey hair and cold allodynia inspection with acetone.

Above-mentioned neuropathic pain may be one of arthritis, muscular pain, and chronic pain.

And this invention provides analysis method of analgesics effect of *Nelumbo nucifera gaertner* to analyze analgesics effect of *Nelumbo nucifera gaertner*, after adding immediate stimulus by administering formalin to the laboratory animal.

Above-mentioned pain may be tonic pain such as inflammation pain.

And, this invention provides *Nelumbo nucifera gaertner* analgesics preparation containing, as an active ingredient, *Nelumbo nucifera gaertner* which has excellent pain relieving effects by using above-mentioned analysis method of analgesics effect.

The main components of above-mentioned *Nelumbo nucifera gaertner* may be one or more of anonaine, asimilobine(R-form), dehydronuciferine, dehydroroemerine, dehydroanoaine, demethylcoclaurine-1-(p-hydroxybenzyl)-6, 7-dihydroxy-1, 2, 3, 4-demethylcoclaurine 1-(p-hydroxybenzyl)-6, 7-dihydroxy-1, 2, 3, 4-tetrahydroisoquinoline, isoliensinine, liensinine, lirnidine, liriogenine.

Execution example 1

1. Neuropathic pain model

A. Outline

Neuropathic pain syndrome is one of the chronic pains such as arthritis, muscular pain, and chronic pain, and is generated when the peripheral nerve or organization receive damage. Neuropathic pain induced by the damage of nerve is terribly painful, frequently relapses even with usual analgesic including opium medicine as well(Tanelian and Cousins, 1989; Brose and Cousins, 1991).

In neuropathic pain syndrome there are hyperalgesia, allodynia, spontaneous pain. Hyperalgesia is the case of inducing more excessive pain by the stimulus which can induce pain normally, allodynia is the case of inducing pain by sensitively reacting to the slight stimulus by which pain can't be induced normally, and spontaneous pain is shown even though there is no stimulus.

Lee, Bae-hwan et al. among these inventors developed a new model(Lee et al.,2000) to damage the offshoot of peripheral part of sciatic nerve. Approaching to the peripheral part of the sciatic nerve, there are three offshoots, and inventors divided them into various groups to be damaged selectively. As a result of comparing with generation degree of neuropathic pain, the fiercest pain was induced in the group of which tibial

nerve and sural nerve damaged leaving common peroneal nerve(Lee et al.,2000). Neuropathic pain induced by the damage of offshoot of sciatic nerve like this increased gradually and reached highest on about two weeks after damage. It showed gradual decrease tendency afterwards but continued until 28 weeks after the operation.

This execution example in which the mechanical allodynia inspection by von-Frey hair and cold allodynia inspection with acetone were executed after making the animal model to induce neuropathic pain syndrome through ligature and cut of tibial nerve and sural nerve of the laboratory animal measured whether the treatment of *Nelumbo nucifera* gaertner showed effects in this inspection.

B. The constitution of experiment

(1) Making of the neuropathic pain model

White rats which weigh 150-200mg are used for the laboratory animal.

First of all, after anesthetizing the rat by halothane, we shave the hair of the hinder leg skin, and disinfect it with povidone iodine solution and isopropyl alcohol. After incising the skin, we look for the sciatic nerve with the stereoscopic zoom microscope, then confirm tibial nerve, common peroneal nerve, and sural nerve in the sciatic nerve to separate them with microforcep from organization and blood vessel in surrounding. Then we cut it with scissors for a minute operation after ligature of tibial nerve and sural nerve with 6.0 silk thread under the microscope while leaving common peroneal nerve. We administer kanamycin dropwise to the incised part, suture the skin, and start the following experiment after recovery.

(2) Injection of Chinese medicine

After exactly measuring 300g of *Nelumbo nucifera* gaertner, we extracted it 3 times using 80% methanol, and added decompression concentration of the extract, then freeze-dried it (-66, 10mmHg). The getting rate of dried *Nelumbo nucifera* gaertner was 7.53%.

We injected into the oral *Nelumbo nucifera* gaertner melted in the physiological saline in capacity of 50mg/10ml/kg, 100mg/10ml/kg, 200mg/10ml/kg, 400mg/10ml/kg. In each experiment group was observed the change of analgesics effect by time course for 2 hours after administration, with pretest before administration of Chinese medicine. And the experiment group to which *Nelumbo nucifera* gaertner was not administered

was used for the comparison group.

(3) Observation of pain reaction

Action inspection concerning neuropathic pain is observed by two weeks after the operation, with several times before and after operation.

We proceed the experiment after stabilizing laboratory animal(rat) by moving to netted cage to see withdrawal reaction to the outside stimulus.

Von Frey filament and acetone are used for stimulus, and von Frey filament for inspection of allodynia to the mechanical stimulus, and we look for the value indicating minimum strength of stimulus which is necessary for response by stimulating from low strength to high strength. It stimulates on the back side of the right and left foot ten times respectively at intervals of a few seconds, and the frequency of the withdrawal reaction of the foot is obtained, then we indicate the value by percentage. Aceton is for inspection of allodynia to the temperature stimulus, added to the both feet five times respectively by five minutes with the injection syringe, after counting the frequency of the withdrawal reaction to the part which pain is induced , we indicate the value by percentage for material.

(4) The procedure of experiment

1. Medicine test is executed on the second day after neuropathic pain operation.
2. Laboratory animals are divided into several groups, with medicine injected into the oral. The physiological saline is injected into the comparison group by the same capacity.
3. We inspect mechanical and cold allodynia

C) The result of experiment

(1) Effect of Chinese medicine on mechanical allodynia

Figure 2 is a graph explaining the control effect on mechanical allodynia of *Nelumbo nucifera gaertner*

Referring to figure 2, the inspection of analgesic effect on mechanical allodynia of Chinese medicine by the stimulus of von frey filament showed the tendency to control the pain but with no change of significance among the groups($F=0.93$, $p>0.46$).

(2) Effect of Chinese medicine on cold allodynia

Figure 3 is a graph explaining the control effect on cold allodynia of *Nelumbo nucifera gaertner*.

Referring to figure 3, the inspection of analgesic effect on cold allodynia of Chinese medicine by the stimulus of acetone showed no change of significance among the groups($F_{4,21}=2.0$, $p>0.12$).

In LSD ex post facto analysis, the difference of significance from the controlled group was shown in the *Nelumbo nucifera gaertner* 400mg group at the time of 60 minutes and 120 minutes($p<0.05$, $p<0.05$ at 60 min, 120min), which means that the pain control effect on cold allodynia was shown in the high-density administered group.

Execution example 2

2. Animal model of formalin test

A. Outline

Traditional pain test such as Tail-flick test and hot-plate test mostly present the stimulus of strong strength temporarily. Pain experience induced like this method is of short duration, so it is not appropriate to estimate the controller originated by stimulus itself. Compared with this, tonic pain different from the pain caused by temporary stimulus can be controlled. Formalin test can be a more appropriate model to inspect clinical pain than test using temporarily presented mechanical or temperature stimulus (Dubuisson amp; Dennis, 1977; Abbott et al., 1981, 1982; Alreja et al., 1984)

Formalin has been used as the material to induce pain early(Lewis amp; Kellgren, 1939; Melzack amp; Melinkoff, 1974), as the stimulus to research the inflammatory reaction of rat's peripheral nerve(Selye, 1949; Winter, 1965). Dubuisson and Dennis described the action induced by formalin minutely in 1977, and developed the method of making pain induced to the amount, a lot of researchers have used this test since then.

If formalin is injected, two characteristic phases showing pain reaction is generated. The first phase generated immediately after the injection continues for about five minutes, the second phase starts in about 20 minutes after the injection (Dubuisson amp; Dennis, 1977). If formalin is injected into man, poorly localized, burning,

throbbing pain is induced, the time course is corresponding to the action change that appears in the animal(Dubuisson and Dennis, 1977). According to the research of Hunskaar and Hole, it is known that acute pain in the first phase is induced by the direct action of formalin on the receptor organ, and tonic pain in the second phase causes inflammatory pain.

Like this, as formalin test is an inspection reflecting acute pain and tonic pain at the same time, it can be said a really appropriate inspection method in examining which medicine decrease acute pain or tonic pain.

For example, Viana et al. (2000) reported that essential oil extracted from Cymbopogon citratus selectively controlled the second phase in formalin test, Leal et al. (2000) reported that various medical herbs from Brazil containing coumarin controlled the second phase in formalin test as well. And Abdel-Fattah et al.(2000) controlled the first phase in formalin test when injecting Nigella sativa oil into rat's oral, reported that if thymoquinone which is the main component of Nigella sativa oil was injected into the oral, celiac, and ventricle of the brain, not only the first phase but also the second could be controlled.

B. Constitution of experiment

(1) Laboratory animal

ICR mice which weigh 25-35g were used in each group by 8-9. Food and water were freely ingestible to the animals which were bred in a cage as a group of 4-5 and they were made to be adjusted to the inspection environment by bring to the laboratory at least two hours before on the day of pain test.

(2) The injection of Chinese medicine

We injected into the celiac Nelumbo nucifera gaertner melted in the physiological saline in the capacity of 50mg/10ml/kg, 100mg/10ml/kg, 200mg/10ml/kg, 400mg/10ml/kg at 30 minutes before the pain inspection. After injecting the medicine into mice, we executed formalin test, and compared it with the result of formalin test using controlled mice.

(3) Experimental apparatus of pain reaction

To observe the pain reaction induced by formalin, we used transparent acrylic fiber to make observation box as shown in figure 4b, of which dimensions was 12×30×13cm.

Under observation box we set up a plane reflector at the angle of 45 degrees as shown in figure 4c, and recorded with camcorder(JVC S-VHS) as shown in figure 4a.

(4) The procedure of experiment

We injected $20\mu\text{l}$ of 2% formalin under the skin of mice's hinder leg etc. by using microsyringe with 26- gauge needle. Immediately after injection, we put mice in the observation box one by one and recorded pain action. For off-line analysis of this pain action, two evaluators per one mouse evaluate amount of time to lick or bite the foot and the leg into which formalin had been injected by five minutes using TV monitor on which pain action was recorded after finishing experiment.

C. The result of experiment

As a result of injecting formalin into the normal animal, characteristic pain reaction of phase 1 and 2 was observed. On this basis we compared the influence of injection of Chinese medicine on pain reaction, the result is presented in figure 5.

Figure 5 shows the change aspect of pain action by time course after injecting formalin.

Phase 1 presents the average of total reactions from immediately after injection of formalin to 10 minutes, phase 2 presents the average of total reactions appearing since then. As seen in drawing 5, there was no difference between *Nelumbo nucifera gaertner* and normal group in phase 1(Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks, $p > .05$), there was a statistical difference of significance ($p < 0.001$) in phase 2 as a result of carrying out Kruskal-Wallis One Way ANOVA on Ranks analysis. And, as a result of multiple comparison using Dunnett's test, *Nelumbo nucifera gaertner* group made a statistical difference of significance from normal group($p < .05$).

This result suggests that *Nelumbo nucifera gaertner* is not effective to decrease acute pain as there was no effect in phase 1, but can be effective to relieve tonic pain such as inflammation pain as there was pain control effect in phase 2.

3. The others

Through the above-mentioned animal model it was analysed that analgesic of which active ingredient is *Nelumbo nucifera gaertner* like this was effective in neuropathic pain such as arthritis, muscular pain, and chronic pain or tonic pain such as inflammation.

The main components of *Nelumbo nucifera* gaertner is anonaine, asimilobine(R-form), dehydronuciferine, dehydroroemerine, dehydroanoaine, demethylcoclaurine-1-(p-hydroxybenzy)-6, 7-dihydroxy-1, 2, 3, 4-demethylcoclaurine 1-(p-hydroxybenzyl)-6, 7-dihydroxy-1, 2, 3, 4-tetrahydroisoquinoline, isoliensinine, liensinine, lirinidine, and liriordenine. Therefore, analgesics effect of *Nelumbo nucifera* gaertner according to above-mentioned execution example can be caused by these components.

Rats were used as the laboratory animal in above-mentioned execution example and experiment example, other animals such as dogs, monkeys etc. can be used. Accordingly, not only rat, mouse but also other animals can be used in pain animal model.

Only extract manufacture was mentioned as the method of preparation in the execution example above, but usually through the pharmacological manufacture of medicine allowed pharmacologically, for example injection, liquid, syrup, tablet, capsule, liquid for acupuncture etc. with shapeless medicine allowed pharmacologically, we can use it as pharmacological preparation for pain prevention and treatment.

The pharmacological composite according to this invention can be administered clinically in the method of oral, coeliac, and subcutaneous administration etc.

Clinical administering capacity of the pharmacological composite according to this invention is possible to be adjusted variously to patient's age, symptom, various types of administration, and kind of medicine. To decide preferable dosage in a specific condition corresponds to an admitted technology.

4. Reference

Abbott FV, Franklin KB, Ludwick RJ, and Melzack R. Apparent lack of tolerance in the formalin test suggests different mechanisms for morphine analgesia in different types of pain. *Pharmacol Biochem Behav* 15:637-640,1981.

Abbott FV. Melzack R, and Samuel C. Morphine analgesia in tail-flick and formalin pain tests is mediated by different neural systems. *Exp Neurol* 75:644-651,1982

Abdel-Fattah AM, Matsumoto K, and Watanabe H. Antinociceptive effects of Nigella

sativa oil and its major component, thymoquinone, in mice. Eur J Pharmacol 400:89-97,2000

Alreja V, Mutualik P, Nayar U, and Manchanda SK. The formalin test: a tonic pain model in the primate. Pain 20:97-104,1984

Brose and Cousins. Subcutaneous lidocaine for treatment of neuropathic cancer pain. Pain 45:145-8,1991

Dubuisson D and Dennis SG. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. Pain 4:161-174,1977

Hunskaar S and Hole K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. Pain 30:103-114,1987.

Leal LKAM, Ferreira AAG, Bezerra GA, Matos FJA, and Viana GSB. Antinociceptive, anti-inflammatory and bronchodilator activities of Brazilian medicinal plants containing coumarin: a comparative study. J Ethnopharmacol 70:151-159,2000

Lee,B.H.,Baik,E.J.,Lee,S.H.,amp; Moon,C.H. Development of behavioral signs of neuropathic pain following injury to distal sciatic nerve branches. Neuroscience Abstracts, p.119, 1996a.

Lee,B.H.,Baik,E.J.,Lee,S.H.,amp; Moon,C.H. An animal model of neuropathic pain employing injury to the sciatic nerve branches. NeuroReport, 11(4):657-661,2000a.

Lewis T and Kellgren JH. Observations relating to referred pain, visceromotor reflexes and other associated phenomena. Clin Sci 4:47-71,1939

Melzack R and Melinkoff DF. Analgesia produced by brain stimulation: Evidence of a prolonged onset period. Exp Neurol 43:369-374, 1974

Mukherjee PK,Saha K, Balasubramanian R, Pal M, Saha BP Studies on psychopharmacological effects of Nelumbo nucifera Gaertn.rhizome extract.

J Ethnopharmacol. 1996 Nov; 54(2-3):63-7

Selye H. Further studies concerning the participation of the adrenal cortex in the pathogenesis of arthritis. Br Med J, 2:1129-1135, 1949

Tanelian and Cousins, Combined neurogenic and nociceptive pain in a patient with Pancoast tumor managed by epidural hydromorphone and oral carbamazepine. Pain. 1989 Jan;36(1):85-8

Ushimaru T, Kanematsu S, Katayama M, Tsuji H Antioxidative enzymes in seedlings of *Nelumbo nucifera* germinated under water.

Physiol Plant.2001 May; 112(1): 39-46

Viana GSB, Vale TG, Pinho RSN, and Matos FJA. Antinociceptive effect of the essential oil from *Cymbopogon citratus* in mice. J Ethnopharmacol 70:323-327, 2000

Winter CA. Anti-inflammatory testing methods: comparative evalution of indomethacin and other agents. In :S.Gavattini and M.N.G.Dukes(Eds), Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs, Vol.82, Excerpta Medica International Congress Series, Amsterdam,1965,pp.190-202

Effect of invention

According to this above-mentioned invention, it is effective to provide the neuropathic pain model as a behavioristic index and the animal model using formalin test used for the analysis of analgesics effect of *Nelumbo nucifera gaertner*.

And, this invention is available to analyze the effective analgesics effect of *Nelumbo nucifera gaertner* by using the neuropathic pain model as a behavioristic index and the animal model using formalin test.

Like this, this invention, in which we inspect control effect on mechanical and cold allodynia in neuropathic pain model, and pain to immediate stimulus and by inflammatory reaction in formalin test, discovered excellent analgesics effect of *Nelumbo nucifera gaertner* by executing the inspection about various indexes on pain which are under way recently.

With this invention proving excellent analgesics effect of *Nelumbo nucifera* gaertner in neuropathic pain model and formalin test, pain relieving effects can be expected for not only the patients who feel pain due to nerve damage but also general disease with pain by using above-mentioned medicine.

(57) The range of claim

Claim paragraph 1

Analysis method of the analgesics effect of *Nelumbo nucifera* gaertner to analyze the analgesics effect of *Nelumbo nucifera* gaertner, executing the inspection of allodynia, after making an animal model to induce neuropathic pain syndrome through ligature and cut of tibial nerve and sural nerve of laboratory animal

Claim paragraph 2

Analysis method of analgesics effect of *Nelumbo nucifera* gaertner characterized in that the inspection of allodynia in the paragraph 1 may be one of mechanical allodynia inspection by von-Frey hair and cold allodynia inspection with acetone

Claim paragraph 3

Analysis method of analgesics effect of *Nelumbo nucifera* gaertner characterized in that neuropathic pain in the paragraph 1 or 2 may be one of arthritis, muscular pain, and chronic pain.

Claim paragraph 4

Analysis method of analgesics effect of *Nelumbo nucifera* gaertner to analyze the analgesics effect of *Nelumbo nucifera* gaertner, after adding immediate stimulus by administering formalin to the laboratory animal.

Claim paragraph 5

Analysis method of analgesics effect of *Nelumbo nucifera* gaertner characterized in that pain in the paragraph 5 may be tonic pain such as inflammation pain.

Claim paragraph 6

Nelumbo nucifera gaertner analgesics preparation containing, as an active ingredient, *Nelumbo nucifera* gaertner of which analgesics effect was analyzed by using analysis method of the analgesics effect.

Claim paragraph 7

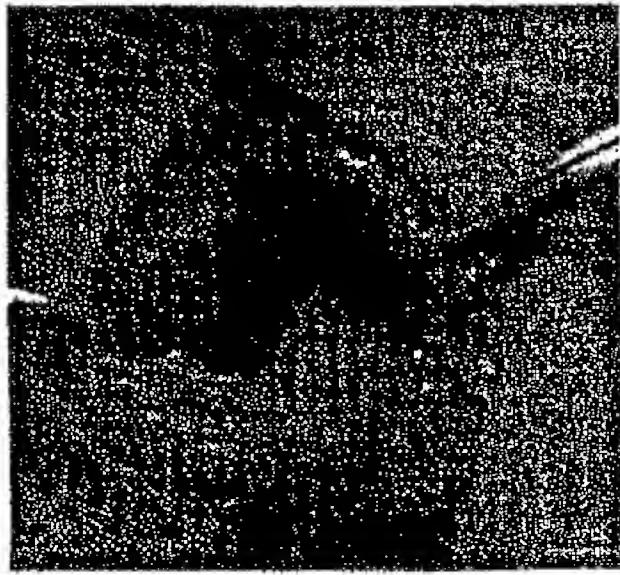
Nelumbo nucifera gaertner analgesics preparation characterized in that analysis method of analgesics effect mentioned in the paragraph 6 may be one of the paragraph 1 and 5.

Claim paragraph 8

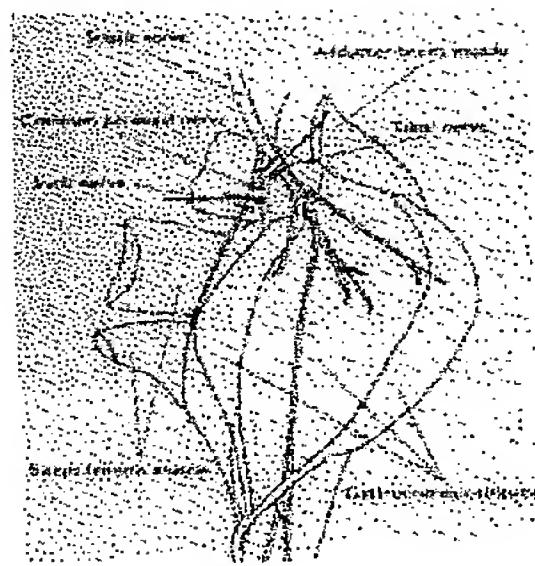
Nelumbo nucifera gaertner analgesics preparation characterized in that the main components of Nelumbo nucifera gaertner in the paragraph 7 may be one or more of anonaine, asimilobine(R-form), dehydronuciferine, dehydroroemerine, dehydroanoaine, demethylcoclaurine-1-(p-hydroxybenzyl)-6, 7-dihydroxy-1, 2, 3, 4-demethylcoclaurine 1-(p-hydroxybenzyl)-6, 7-dihydroxy-1, 2, 3, 4-tetrahydroisoquinoline, isoliensinine, liensinine, lirnidine, and liriordenine.

Drawings

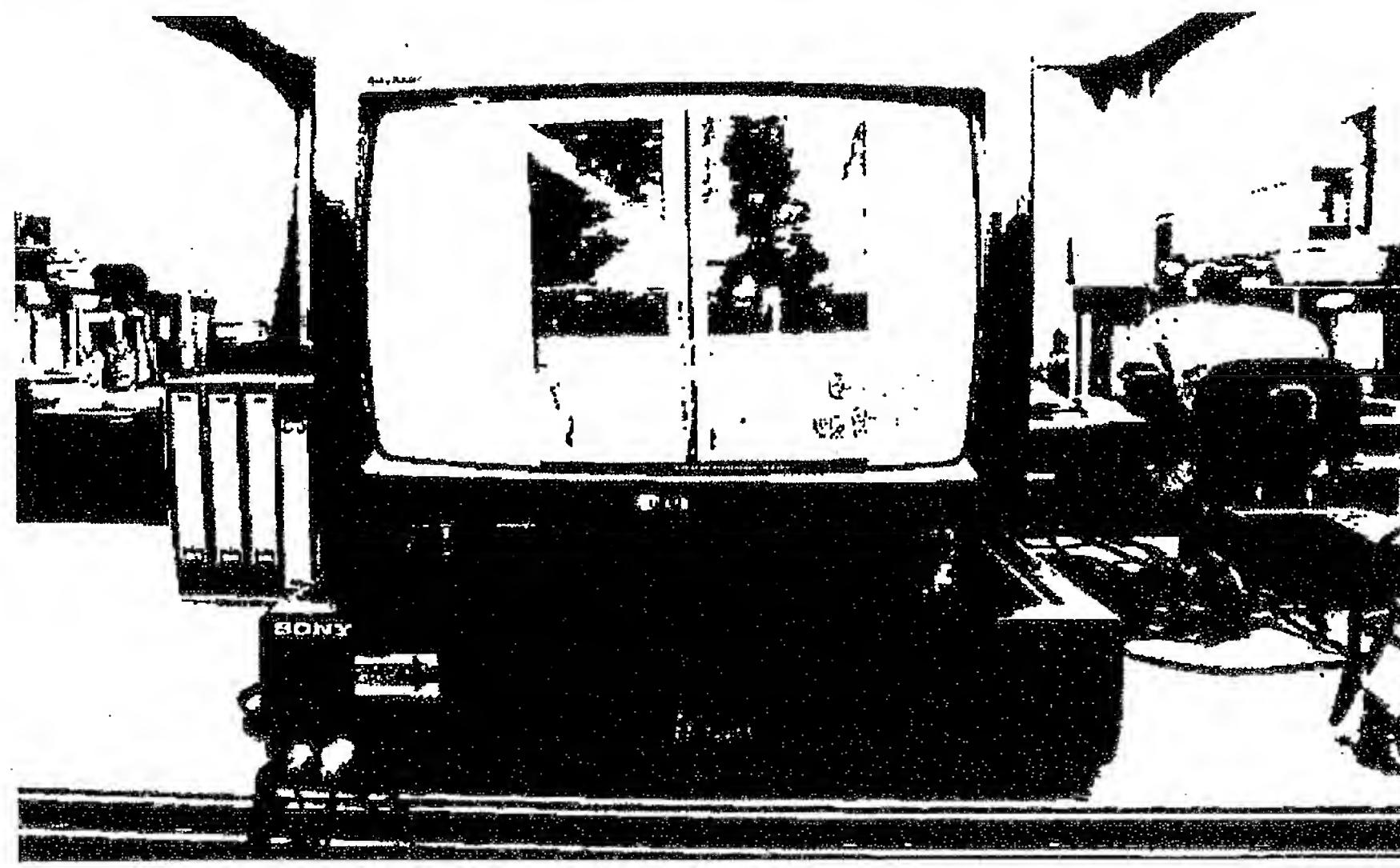
Drawing 1a



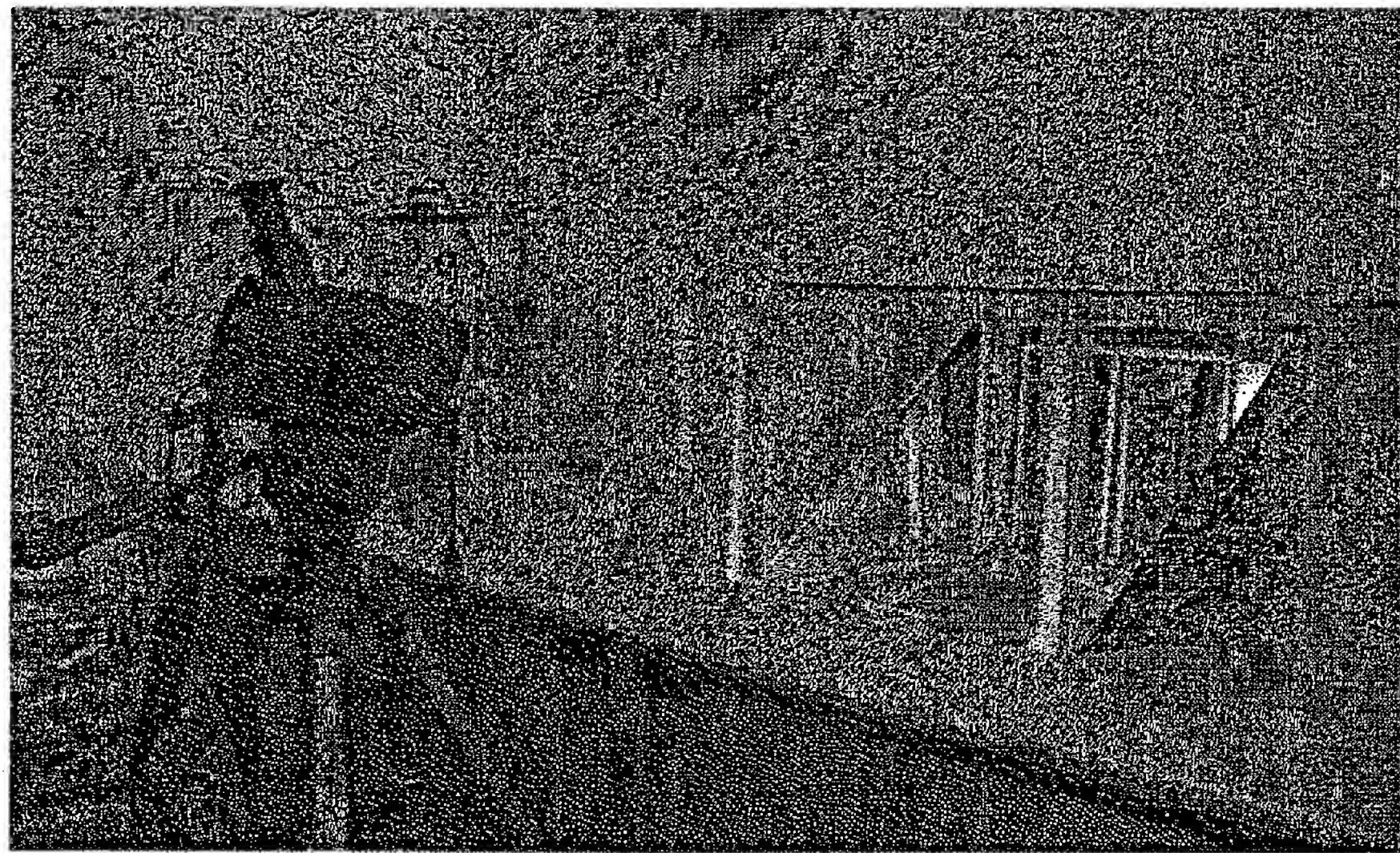
Drawing 1b



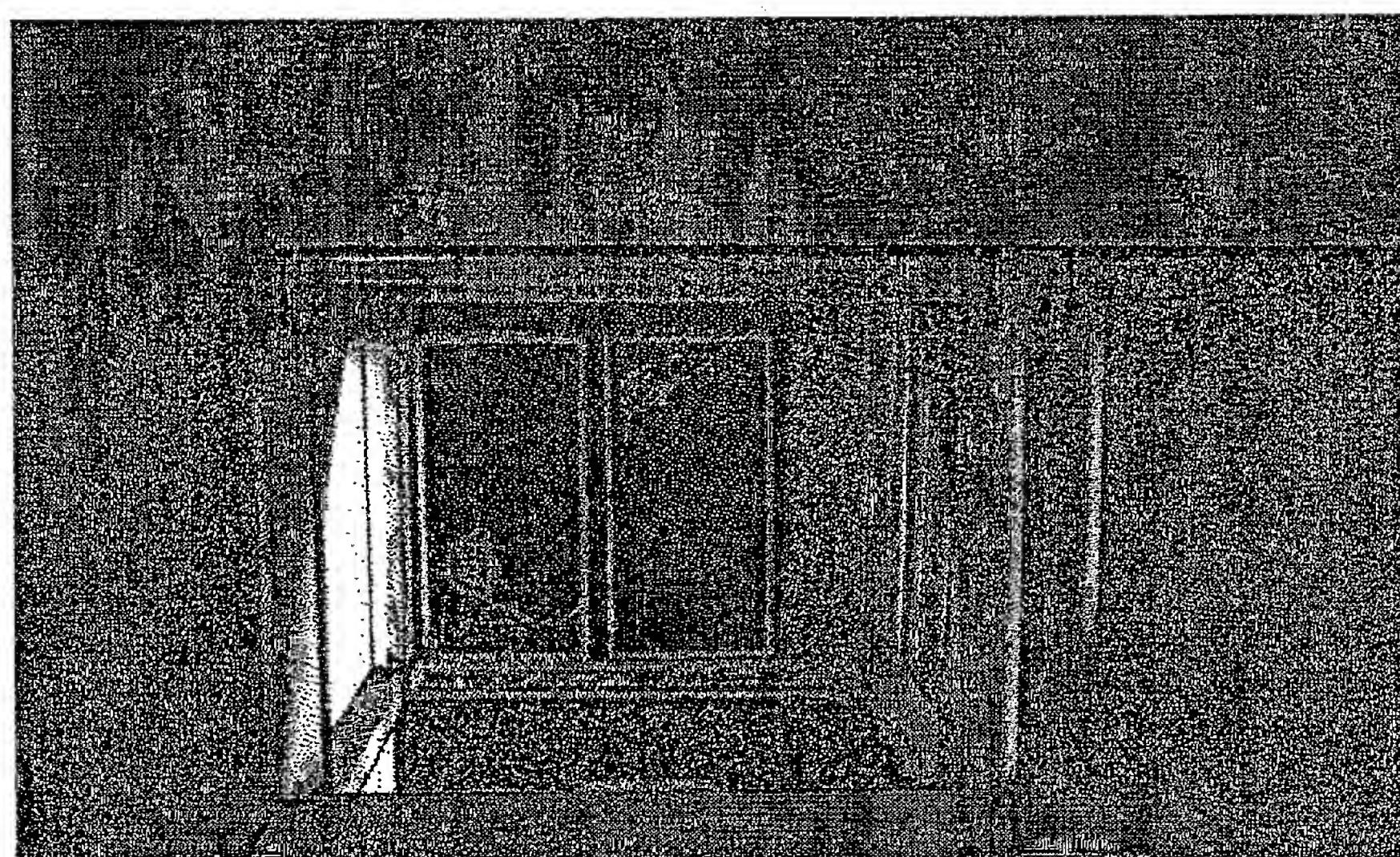
Drawing 2a



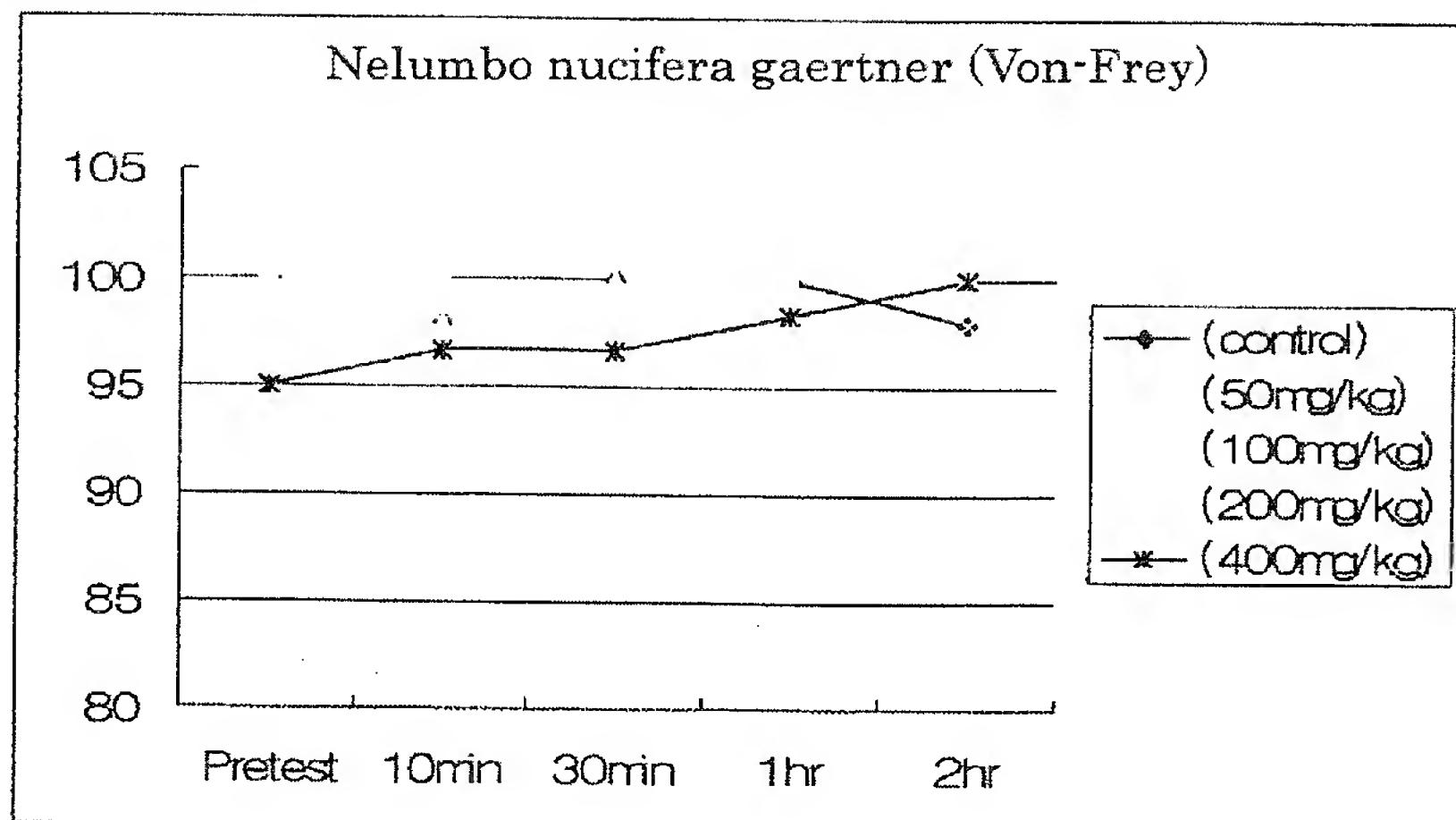
Drawing 2b



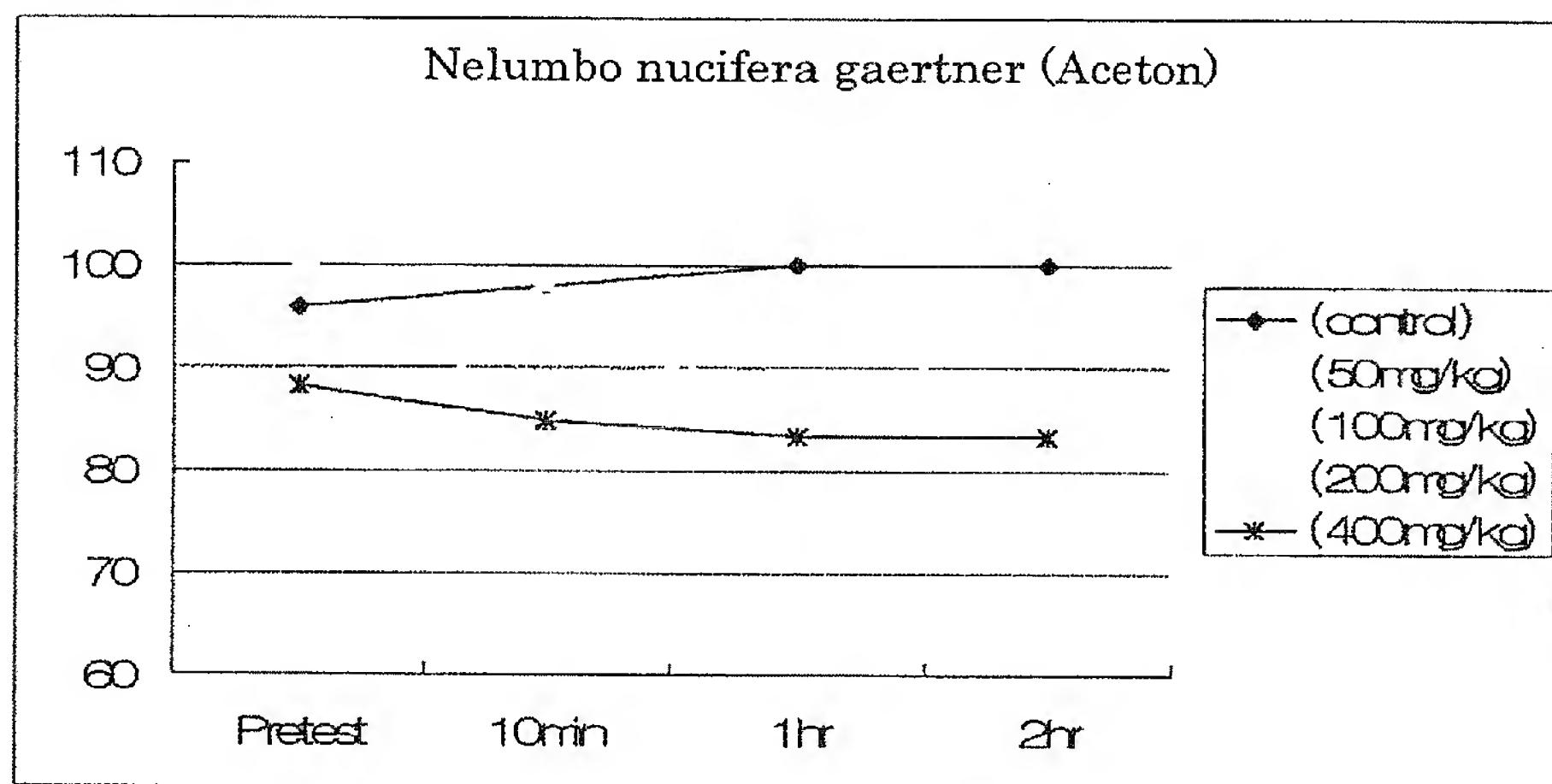
Drawing 2c



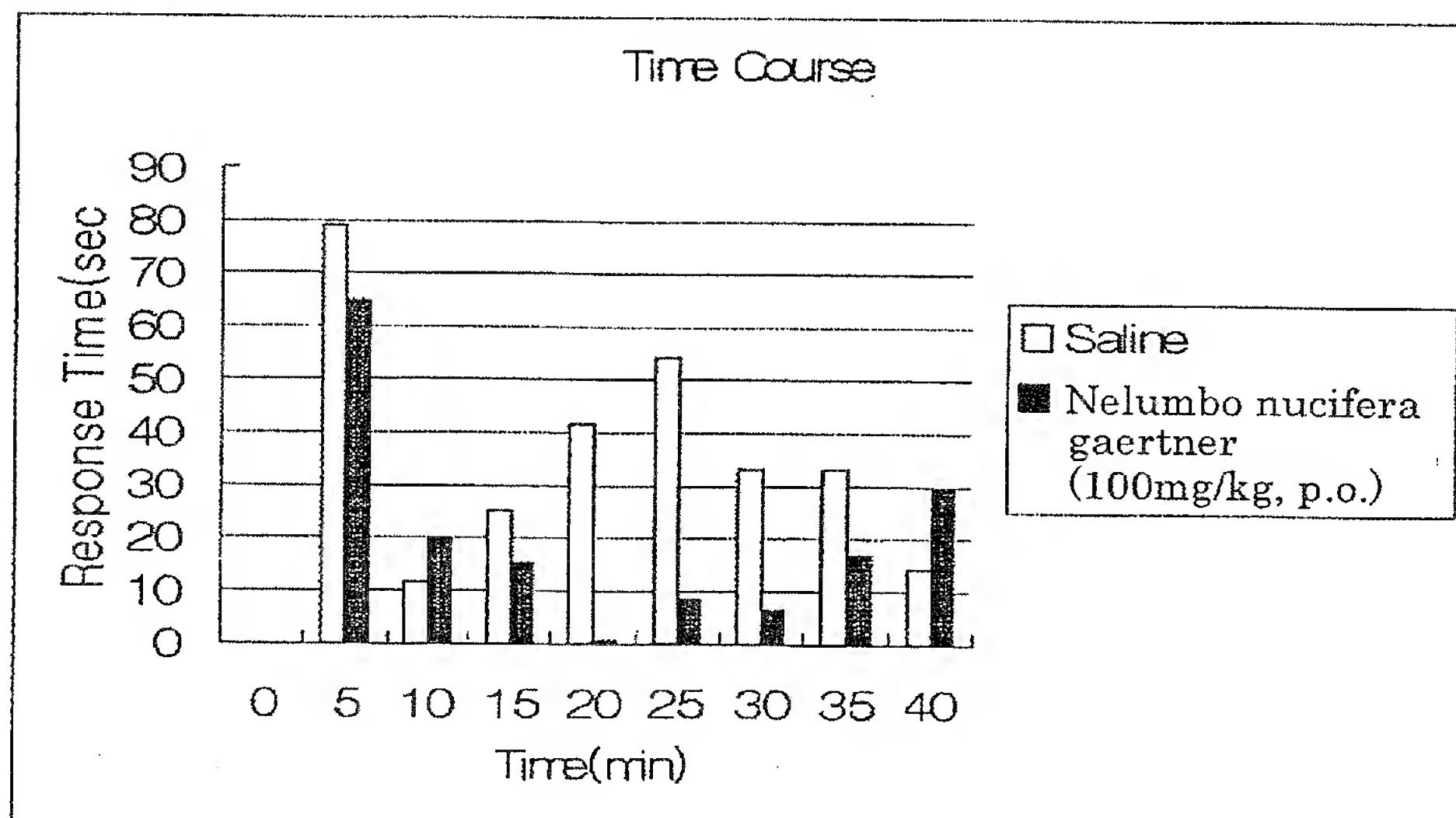
Drawing 3



Drawing 4



Drawing 5



(19) Korean Industrial Property Office

Korean Patent Abstracts

(11) Publication number: 10-2004-0026175 A

(44) Date of publication of specification: 30.03.04

(21) Application number: 1020020057535

(71) Applicant: Kyunghee University

Shim, In-sop

(22) Date of filing: 23.09.02

(72) Inventor: Ham, Dae-hyeon

Han, Seung-mu

Hwang, Hye-jeong

Kim, Chang-ju

Kim, Gyeong-a

Lee, Bae-hwan

Lee, Hye-jeong

Lee, Ji-suk

Lim, Sabina

Park, Hi-jun

Shim, In-sop

(51) Int.CI A61K 35/78

(54) Analysis of Analgesics Effect of

Nelumbo Nucifera Gaertner and

Analgesics Preparation Containing

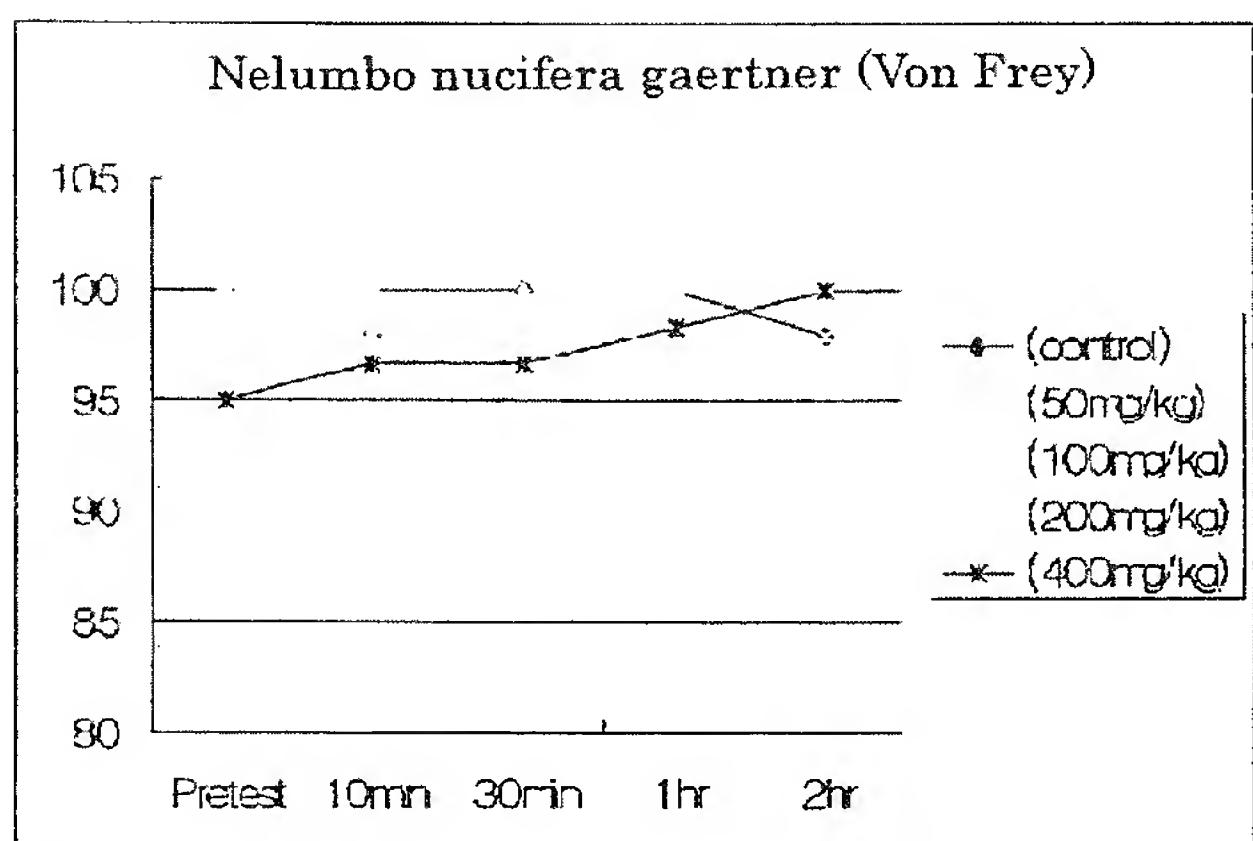
Lonicera Japonica Thunberg

(57) Abstract:

PURPOSE: Provided are an analysis method of Analgesics effect of Nelumbo nucifera gaertner and an Analgesics preparation containing, as an active Ingredient, Nelumbo nucifera gaertner which has Excellent pain relieving effects.

CONSTITUTION: An analysis method of analgesics effect of Nelumbo nucifera gaertner is characterized by using formalin test with a neuropathic pain model. An analgesics preparation containing, as an active ingredient, Nelumbo nucifera gaertner has excellent pain relieving effects on tonic pain, such as inflammation pain. The main components of Nelumbo nucifera gaertner include anonaine, asimilobine,

dehydronuciferine, dehydroroemerine, dehydroanonaine,
demethylcoclaurine 1-(p-hydroxybenzyl)-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline, is
oliensinine, liensinine, lirnidine and liriordenine.



© KIPO 2004



KOREAN PATENT ABSTRACTS

(11) Publication number: 1020040026175 A

(44) Date of publication of specification: 30.03.04

(21) Application number: 1020020057535

(71) Applicant: KYUNGHEE UNIVERSITY SHIM, IN SOP

(22) Date of filing: 23.09.02

(72) Inventor: HAM, DAE HYEON
HAN, SEUNG MU
HWANG, HYE JEONG
KIM, CHANG JU
KIM, GYEONG A
LEE, BAE HWAN
LEE, HYE JEONG
LEE, JI SUK
LIM, SABINA
PARK, HI JUN
SHIM, IN SOP

(51) Int. Cl

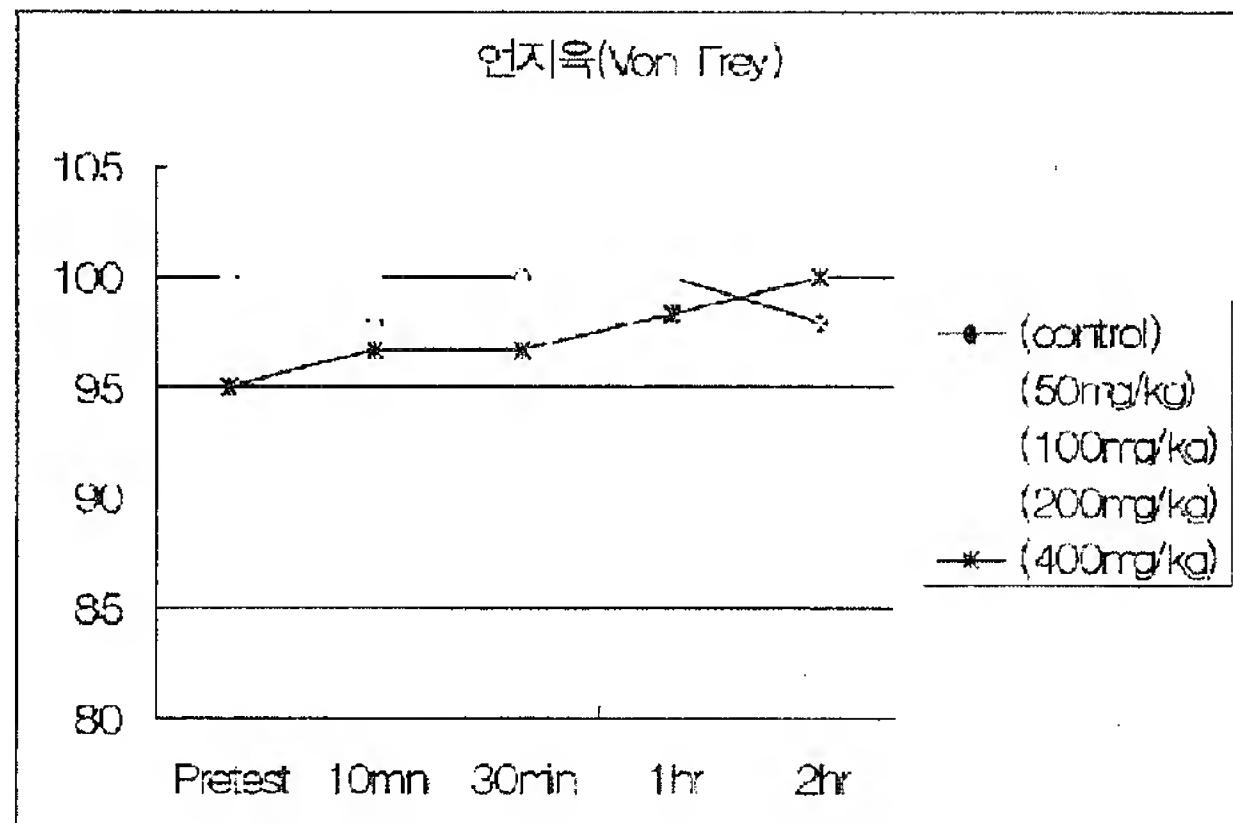
A61K 35/78

(54) ANALYSIS OF ANALGESICS EFFECT OF
NELUMBO NUCIFERA GAERTNER AND
ANALGESICS PREPARATION CONTAINING
LONICERA JAPONICA THUNBERG

(57) Abstract:

PURPOSE: Provided are an analysis method of analgesics effect of *Nelumbo nucifera gaertner* and an analgesics preparation containing, as an active ingredient, *Nelumbo nucifera gaertner* which has excellent pain relieving effects.

CONSTITUTION: An analysis method of analgesics effect of *Nelumbo nucifera gaertner* is characterized by using formalin test with a neuropathic pain model. An analgesics preparation containing, as an active ingredient, *Nelumbo nucifera gaertner* has excellent pain relieving effects on tonic pain, such as inflammation pain. The main components of *Nelumbo nucifera gaertner* include anonaine, asimilobine, dehydrorunciferine, dehydroroemerine, dehydroanonaine, demethylcoclaurine1-(p-hydroxybenzyl)-6,7-dihydroxy-1,2-3,4-tetrahydroisoquinoline, isoliensinine, liensinine, lirnidine and liriordenine.



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) . Int. Cl. 7
 A61K 35/78

(11) 공개번호 10- 2004- 0026175
 (43) 공개일자 2004년03월30일

(21) 출원번호 10- 2002- 0057535
 (22) 출원일자 2002년09월23일

(71) 출원인 학교법인 경희대학교
 경기도 용인시 기흥읍 서천면 1 번지

심인섭
 경기 성남시 분당구 분당동 샛별마을삼우아파트 401- 201

(72) 발명자 심인섭
 경기 성남시 분당구 분당동 샛별마을삼우아파트 401- 201

황혜정
 경상북도 문경시 산양면 진정리 138번지

함대현
 서울 성동구 성수1가2동 동아그린아파트 101- 704

임사비나
 서울특별시 성북구 석관동 10번지 두산아파트 115동 1702호

이혜정
 경기 용인시 수지읍 풍덕천리 동문아파트 103- 701

이배환
 서울특별시 서대문구 영천동 100번지 톡립문 삼호아파트 108동 1407호

김창주
 서울특별시 종로구 신영동 249- 5번지

한승무
 경기도 용인시 수지읍 상현마을 금호베스트빌 252동 804호

박하준
 서울특별시 동대문구 이문동 삼성래미안아파트 101동 1102호

이지숙
 경기도 군포시 산본동 1145 세종아파트 643동 403호

김경아
 부산광역시 남구 대연동 243- 23 청구아파트 104동 1003호

(74) 대리인 김은구

심사청구 : 있음

(54) 연자율의 진통효과 검증방법 및 연자율 진통 제제

요약

본 발명은, 행동학적 지표인 신경병리성 통증(neuropathic pain) 모델과 포르말린 테스트(formalin test)를 이용한 동물모델을 이용한 통증에 대한 연자육의 진통효과 검증방법 및 이 진통효과 검증방법을 이용하여 진통효과가 검증된 연자육을 유효성분으로 하는 연자육 진통 제제에 대한 것으로, 신경손상으로 통증을 느끼는 통통환자뿐만 아니라, 일반 통통질환에도 상기 약재의 이용을 통하여 통증 완화효과를 기대할 수 있다.

대표도

도 3

명세서

도면의 간단한 설명

도1a 및 도1b는 본 발명에 따른 신경병리성 통증 모델의 통증부위 사진 및 개념도.

도2는 본 발명에 따른 연자육의 기계적 이질통 억제에 미치는 효과 그래프.

도3은 본 발명에 따른 연자육의 냉각 이질통 억제에 미치는 효과 그래프.

도4a는 본 발명에 사용되는 포르말린 테스트 장치의 사진.

도4b 및 도4c는 포르말린 테스트에 의한 동물의 행동 사진들.

도5는 본 발명에 따른 연자육의 포르말린 테스트에 따른 연자육의 통증의 억제에 미치는 효과 그래프

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 행동학적 지표인 신경병리성 통증(neuropathic pain) 모델과 포르말린 테스트(formalin test)를 이용한 동물모델을 이용한 통증에 대한 연자육의 진통효과 검증방법 및 이 진통효과 검증방법을 이용하여 진통효과가 검증된 연자육을 유효성분으로 하는 연자육 진통 제제에 대한 것이다.

통증, 특히 만성 통증(chronic pain)은 인간에게 몹시 견디기 어려운 것으로, 만성 통증을 가진 환자는 그 아픔 때문에 정상적인 생활을 영위하는데 많은 어려움을 겪게 된다. 이러한 고통으로부터 해방되기 위해 환자는 통증을 호소하며 도움을 청하게 되며, 통증을 제어하고자 하는 노력은 의학계에서 끊임없이 진행되어져 왔다. 한약은 오랜 기간동안 전통한의학에서 사용되어져 통증에 대한 우수한 치료효과를 보여 왔다. 최근 여러 가지 한약재가 통증 억제에 어떠한 영향을 미치며 어떠한 작용기전에 매개되는지를 연구할 필요성이 제기되어 왔다.

기존에 한약물을 이용한 진통억제효과에 대한 보고를 살펴보면, 우슬약침액은 CFA(complete Freund's adjuvant) 관절염 유발 쥐에 작용하여 염증을 억제시키고, 염증상태를 나타내는 백혈구의 충수를 유의성있게 감소시키며, 혈청 내 면역 글로불린(Globulin) 및 알부민(albumin)에 작용하여 조직학적으로 근육조직의 고사를 억제시켜 관절염으로 인한 염증에 대하여 치유 효과를 나타내는 등의 효과가 검증된 바 있었다. 또한, 포공영은 초산법을 이용하여 Writhing syndrome의 빈도를 측정한 결과 포공영의 진통효과가 유의성 있었다. 또한, 초산법과 후지가압법에 의해 갈근을 주재로 한 갈근해기탕의 진통효과가 인정되었다.

한편, 이전연구에서 연자육을 이용하여 항산화효과(Ushimaru 등, 2001) 와 진정작용과 근이완 효과(Mukherjee 등, 1996)가 보고되었으나 통증모델에서 통증억제에 관한 보고는 거의 없었다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명은 상기와 같은 종래기술의 필요성과 문제점을 해결하기 위한 것으로, 연자육의 유효한 진통효과를 검증하기 위해 사용되어지는 행동학적 지표인 신경병리성 통증(neuropathic pain) 모델과 포르말린 테스트(formalin test)를 이용한 동물모델을 제공하는 것을 그 목적으로 한다.

또한, 본 발명의 목적은, 행동학적 지표인 신경병리성 통증(neuropathic pain) 모델과 포르말린 테스트(formalin test)를 이용한 동물모델을 이용하여 연자육의 유효한 진통효과를 검증하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

이러한 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은, 실험동물의 경골신경과 비복신경의 결찰 및 절단을 통해 신경병리성 통증증후군을 유발할 수 있는 동물모델을 만든 다음, 이질통 검사를 실시하여 통증에 대한 연자육의 진통효과를 검증하는 연자육의 진통효과 검증방법을 제공한다.

상기 이질통 검사는 폰 프레이 헤어(von- Frey hair)에 의한 기계적 이질통 검사와 아세톤(acetone)에 의한 냉각 이질통 검사 중 어느 하나일 수 있다.

상기 신경병리성 통증은 관절염, 근육통, 만성통 중 어느 하나일 수 있다.

또한 본 발명은, 실험동물에 포르말린을 투여하여 실험동물에 직접적 자극을 가한 다음, 연자육의 통증에 대한 진통효과를 검증하는 연자육의 진통효과 검증방법을 제공한다.

상기 통증은, 염증성 통증(inflammation pain)과 같은 지속성 통증(tonic pain)일 수 있다.

또한 본 발명은, 상기 진통효과 검증방법을 이용하여 진통효과가 검증된 연자육을 유효성분으로 하는 연자육 진통제제를 제공한다.

상기 연자육의 주요성분은, 아노나인(Anonaine), 아시미로빈(Asimilobine)(R- form), 디하이드로뉴시페린(Dehydro nuciferine), 디하이드로에메린(Dehydroroemerine), 디하이드로아노나인(Dehydroanonaine), 디메틸코크라우린 1- (p- 하이드록시벤질)- 6,7- 디하이드록시- 1,2,3,4- 테트라하이드로이소퀴놀린(Demethylcoclaurine1- (p- Hydroxy benzyl)- 6,7- dihydroxy- 1,2,3,4- tetrahydroisoquinoline), 이소리엔시닌(Isoliensinine), 리엔시닌(Liensinine), 리리니딘(Lirinidine), 리리오데닌(Liriordenine) 중 어느 하나 또는 하나 이상일 수 있다.

실시예1

1. 신경병리성 통증 모델

가. 개요

신경병리성 통증 증후군(neuropathic pain syndrome)은, 관절염, 근육통, 만성통과 같이 만성 통증의 하나로서 말초신경이나 조직이 손상을 받았을 때 발생하게 된다. 신경의 손상으로 인해 유발되는 신경병리성 통증(neuropathic pain)은 매우 고통스러울 뿐만 아니라, 아편제를 비롯한 통상적인 진통제를 사용하더라도 자주 재발된다(Tanelian and Cousins, 1989; Brose and Cousins, 1991).

신경병리성 통증의 증후군은 과통증(hyperalgesia), 이질통(allodynia), 자발적 통증(spontaneous pain) 등이 있다. 정상의 경우에도 통증을 유발시킬 수 있는 정도의 자극에 대해 그 이상의 과도한 통증을 유발하는 것을 '과통증'이라고 하고, 정상적으로는 통증을 유발시킬 수 없을 정도의 미약한 자극에 민감하게 반응하여 통증을 유발하는 경우를 '이질통'이라 하며, 아무런 자극이 없는 경우에도 통증이 나타나는 것을 '자발적 통증'이라고 한다.

본 발명자들중 이배환 등은 좌골신경의 말초 쪽의 분지를 손상시키는 새로운 모델(Lee et al., 2000)을 개발하였다. 좌골신경에 말초 쪽에서 접근하면 3개의 분지가 있는데, 이를 신경 분지를 여러 가지 집단으로 나누어 선택적으로 손상시켜 신경병리성 통증이 발생되는 정도를 비교한 결과, 총비골신경(common peroneal nerve)은 남겨두고, 경골신경(tibial nerve)과 비복신경(sural nerve)을 손상시킨 집단에서 가장 격심한 통증 증상이 유발되었다(Lee et al., 2000). 이러한 좌골신경 분지의 손상으로 유발된 신경병리성 통증은 손상이 일어난 후 점차 증가하다가 손상 후 2주 정도에서 최고도에 달하였다. 그 후 점차 감소하는 추세를 보였으나 수술 후 약 28주에 이르기까지 지속되었다.

본 실시예는, 실험동물의 경골신경과 비복신경의 결찰 및 절단을 통해 신경병리성 통증증후군을 유발할 수 있는 동물 모델을 만든 다음, 폰프레이 헤어(von-Frey hair)에 의한 기계적 이질통 검사와 아세톤(acetone)에 의한 냉각 이질통 검사를 실시하여 연자육의 처치가 이러한 검사에서 유효한 효과가 나타나는지를 측정하였다.

나. 실험내용

(1) 신경병리성 통증 모델 제작

실험동물로는 체중 150-200 gm내외의 흰쥐를 사용한다.

먼저 할로세인(halothane)으로 쥐를 마취시킨 후 뒷다리 피부의 털을 깎고 포비돈 아이오다인 (povidone iodine) 용액과 이소프로필 알콜(isopropyl alcohol)로 소독한다. 피부를 절개한 후 실체 줌 현미경을 사용하여 좌골신경을 찾아 좌골신경에서 경골 신경(tibial nerve)과 비골신경(common peroneal nerve) 및 비복신경(sural nerve)를 확인한 후 마이크로포셉(microforcep)으로 주변 조직 및 혈관으로부터 분리시킨 다음, 총비골신경(common peroneal nerve)은 남겨두고, 경골 신경(tibial nerve)과 비복신경(sural nerve)은 현미경 하에서 6.0 명주실(silk thread)로 결찰한 후 미세 수술 가위로 절단한다. 절개된 부위는 카나마이신(kanamycin)을 점적하고 피부를 봉합하여 회복한 후 다음 실험에 들어간다.

(2) 한약재의 주입

연자육 300g을 정확히 평량한 후, 수육상에서 80% 메탄올을 사용하여 3회 추출하였으며, 추출물을 감압 농축한 후 그 추출물을 둘결건조(-66, 10mmHg)시켜 분말 건조하였다. 건조시켜 얻은 연자육의 수득률은 7.53%이다.

연자육은 생리식염수에 녹여 50mg/10ml/kg, 100mg/10ml/kg, 200mg/10ml/kg, 400mg/10ml/kg의 용량으로 구강내 주입하였다. 각 실험군은 한약재 투여전의 pretest를 실시한 후, 한약재를 투여하고 난 후 2시간 동안 시간경과에 따른 진통효과의 변화를 관찰하였다. 한편, 연자육을 투여하지 않은 실험군을 대조군으로 사용하였다.

(3) 통증 반응의 관찰

신경병리성 통증에 관한 행동 검사는 수술전, 수술후 여러 차례에 걸쳐 시행하여 수술 후 2주 까지 관찰한다.

외부 자극에 대한 철회반응(withdrawal response)을 보기 위해 실험 동물(쥐)을 망으로 된 우리(cage)에 옮겨 안정시킨 후 실험을 진행한다.

자극은 폰 프레이 필라멘트(von Frey filament), 아세톤(acetone)을 사용하는데, 폰 프레이 필라멘트(von Frey filament)는 기계적 자극에 대한 이질통을 검사하기 위한 것으로서 낮은 강도에서 높은 강도로 자극하여 반응의 억지를 찾는다. 이는 수초 간격으로 좌우 발바닥에 각각 10회씩 자극하여, 발의 철회반응의 횟수를 얻어 백분율로 표시한다. 아세톤(acetone)은 온도자극에 대한 이질통을 검사하기 위한 것으로서, 양쪽 발에 5분 간격으로 각각 5회씩 주사기를 이용, 통각유발부위에 가하여 철회반응의 횟수를 센 다음 백분율을 자료로 삼는다.

(4) 실험절차

- ① 신경병리성 통증(neuropathic pain) 수술후 2주일째 되는 날 약물검사를 실시한다.
- ② 실험동물을 여러 집단으로 나누고 약물은 구강에 주입한다. 대조군은 생리식염수 동일 용량을 주입한다.
- ③ 기계적 이질통(mechanical allodynia), 냉각 이질통(cold allodynia)을 검사한다.

다. 실험결과

(1) 기계적 이질통에 대한 한약재의 효능

도2는, 연자육의 기계적 이질통 억제에 미치는 효과 그래프이다.

도2를 참조하면, von frey filament 자극에 대한 기계적 이질통에 대한 한약재의 진통효과 검사에서 통증억제의 경향성은 보였으나 집단간 유의미한 차이는 보이지 않았다($F=0.93$, $p>0.46$).

(2) 냉각 이질통에 대한 한약재의 효능

도3은 연자육의 냉각 이질통 억제에 미치는 효과 그래프이다.

도3을 참조하면, 아세톤(acetone) 자극에 대한 냉각 이질통에 대한 한약재의 진통효과 검사에서 집단간 유의미한 차이는 보이지 않았다($F_{4,21}=2.0$, $p>0.12$).

LSD사후검정에서 60분과 120분때에 연자육400mg집단에서 통제집단과 유의미 한 차이를 보여($p<0.05$, $p<0.05$ at 60 min, 120 min) 냉각이질통에 대해 고농도 투여군에서 통증억제효과를 보였다.

실시예2

2. 포르말린 테스트(formalin test) 동물모델

가. 개요

Tail-flick test와 hot-plate test와 같은 전통적인 통증 검사는 대부분 강한 강도의 자극을 일시적으로 제시한다. 이와 같은 방식으로 유발되는 통증 경험은 지속기간이 짧고, 따라서 자극 자체에 의해 개시되는 조절 기전을 평가하는데에는 적절하지 못하다. 이에 비해 지속성 통증(tonic pain)은 일시적인 자극에 의해 유발되는 통증과는 다르게 조절될 수 있다. 포르말린 테스트(formalin test)는 일시적으로 제시되는 기계적 또는 온도 자극을 사용한 검사보다도 일상적인 통증을 검사할 수 있는 보다 타당한 모델이라 할 수 있다(Dubuisson amp; Dennis, 1977; Abbott et al., 1981, 1982; Alreja et al., 1984).

포르말린(formalin)은 일찍이 통각 유발물질로 사용되어 왔으며(Lewis amp; Kellgren, 1939; Melzack amp; Melin koff, 1974), 쥐에서 말초의 염증 반응을 연구하는 자극으로도 사용되어 왔다(Selye, 1949; Winter, 1965). 1977년 Dubuisson과 Dennis는 포르말린(formalin)으로 유발되는 행동을 자세히 기술함은 물론, 유발된 통증을 수량화하기 위한 방식을 개발하였으며, 이후 수많은 연구자들이 이 검사를 이용해 왔다.

포르말린(formalin)을 주입하면 통증 반응을 나타내는 두 가지 독특한 페이즈(phase)가 발생한다. 첫 번째 페이즈(phase)는 주입 직후 발생하는 것으로 약 5분간 지속되고, 두 번째 페이즈(phase)는 주입 후 약 20분후 시작한다(Dubuisson amp; Dennis, 1977). 인간에게 포르말린(formalin)을 주입하면 국부적인 화끈거리는 통각, 박동통(poorly localized, burning, throbbing pain)을 야기하며, 그 시간경과(time course)는 동물에게서 나타나는 행동적 변화와 일치한다(Dubuisson amp; Dennis, 1977). Hunskaar와 Hole의 연구(1987)에 의하면 첫 번째 페이즈(phase)는 포르말린(formalin)이 직접수용기에 작용하여 급성 통증(acute pain)을 야기하고, 두 번째 페이즈(phase)는 지속성 통증(tonic pain)으로서 염증성 통증을 일으키는 것으로 알려져 있다.

이와 같이 포르말린 테스트(formalin test)는 급성 통증(acute pain)과 지속성 통증(tonic pain)을 동시에 반영하는 검사이기 때문에 어떤 약물이 급성 통증(acute pain)을 감소시키는지 아니면 지속성 통증(tonic pain)을 감소시키는지를 알아보는 데에는 매우 적절한 검사법이라 할 수 있다.

예를 들면, Viana 등(2000)은 레몬그라스(Cymbopogon citratus)에서 추출한 정류(essential oil)가 포르말린 테스트(formalin test)에서 두 번째 페이즈(phase)를 선택적으로 억제함을 보고하였으며, Leal 등(2000)은 쿠마린(coumarin)을 함유하고 있는 브라질산 여러 약초들이 마찬가지로 포르말린 테스트(formalin test)의 두 번째 페이즈(phase)를 억제함을 보고하였다. 또한 Abdel-Fattah 등(2000)은 니겔라 오일(Nigella sativa oil)을 쥐의 구강으로 주입 한 경우 포르말린 테스트(formalin test)에서 첫 번째 페이즈(phase)를 억제하였으며, 니겔라 오일(Nigella sativa oil)의 주성분인 티모퀴논(thymoquinone)을 구강, 복강, 뇌실을 통해 주입하였을 때에는 포르말린 테스트(formalin test)에서 첫 번째 뿐만 아니라 두 번째 페이즈(phase)도 억제됨을 보고하였다.

나. 실험내용

(1) 실험동물

체중 25-35g되는 ICR 마우스를 각 집단에 8-9마리씩 사용하였다. 동물은 한 우리에 4-5마리씩 집단으로 사육하였으며 먹이와 물은 자유로이 섭취하게 하였으며, 통증 검사 당일 최소한 2시간 전에 실험실로 데려와 검사 환경에 적응할 수 있게 하였다.

(2) 한약재의 주입

연자육는 생리식염수에 녹여 50mg/10ml/kg, 100mg/10ml/kg, 200mg/10ml/kg, 400mg/10ml/kg의 용량으로 통증 검사 30분전에 복강내 주입하였다. 약물을 쥐에게 주입하고 포르말린 테스트(formalin test)를 실시하였으며, 이를

정상 쥐(controll)를 사용한 포르말린 테스트(formalin test) 결과와 비교하였다.

(3) 등통 반응의 실험장치

포르말린(formalin)으로 유발된 통증 반응을 관찰하기 위해 도4b와 같이 투 명 아크릴을 이용하여 관찰 상자를 제작 하였는데, 그 제원은 12×30×13cm이었다. 관찰 상자의 아래에 도4c와 같이 평면 반사경을 45도의 각도로 설치하고, 도4a와 같이 camcorder(JVC S-VHS)를 이용하여 기록하였다.

(4) 실험절차

26-gauge needle이 달린 미세주사기(microsyringe)를 사용하여 쥐(mouse) 뒷발등 피하에 2% 포르말린(formalin)을 $20\mu\text{l}$ 주사하였다. 주입 직후 쥐를 관찰 상자에 한 마리씩 넣고 통증 행동을 기록하였다. 이러한 통증 행동의 off-line 분석을 위해, 실험을 마친 뒤 기록된 통증 행동을 TV 모니터(TV monitor)를 이용하여 한 마리의 마우스 당 두 명의 평가자가 포르말린이 주입된 발이나 다리를 핫거나 깨무는 시간의 양을 5분 단위로 평가하였다.

다. 실험결과

정상동물에게 포르말린(formalin)을 주입한 결과 특징적인 페이즈1(phase 1)과 페이즈2(phase 2)의 통증 반응이 잘 관찰되었다. 이를 근간으로 한약재의 주입이 통증 반응에 미치는 영향을 비교하였는데 그 결과는 도5에 제시되어 있다.

도5는 포르말린(formalin) 주입 후 시간 경과에 따른 통증 행동의 변화 양상을 보여주고 있다.

페이즈1(Phase 1)은 포르말린(formalin) 주입 직후부터 10분까지의 반응을 합한 평균을, 페이즈2(phase 2)는 그 이후에 나타나는 반응의 합을 평균하여 제시 한 것이다. 도5에서 볼 수 있는 바와 같이, 페이즈1(phase 1)에서는 연자육 가 정상(normal or control) 집단과 아무런 차이가 없었으나(Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks, $p>.05$), 페이즈2(Phase 2)에서는 Kruskal-Wallis One Way ANOVA on Ranks 검증을 수행한 결과 통계적으로 유의미한 차가 있었다($p<0.001$). 또한, Dunnett's test를 사용한 multiple comparison 결과, 연자육 집단은 정상 집단과 통계적으로 유의미한 차이가 있었다($p<.05$).

이러한 결과는 연자육가 페이즈1(phase 1)에는 별다른 효과가 없었으므로 급성 통증(acute pain)을 감소시키는 데에는 효과적이지 않지만, 페이즈2(phase 2)에서는 통증 억제 효과를 나타내므로 염증성 통증(inflammation pain)과 같은 지속성 통증(tonic pain)을 완화시키는데 효과적일 수 있다는 것을 시사한다.

3. 기타

이러한 연자육을 유효성분으로 하는 진통제는, 관절염, 근육통, 만성통과 같은 신경병리성 등통이나, 염증성 통증(inflammation pain)과 같은 지속성 통증(tonic pain)에 효과가 있을 것임은 상기 동물모델들을 통해 검증되었다.

연자육의 주요성분은 아노나인(Anonaine), 아시미로빈(Asimilobine)(R-form), 디하이드로뉴시페린(Dehydronuciferine), 디하이드로로에메린(Dehydroroemerine), 디하이드로아노나인(Dehydroanonnaine), 디메틸코크라유린1-(p-하이드록시벤질)-6,7-디하이드록시-1,2,3,4-테트라하이드로이소퀴놀린(Demethylcoclaurine1-(p-Hydroxybenzyl)-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline), 이소리엔시닌(Isoliensinine), 리엔시닌(Liensinine), 리리니딘(Lirinidine), 리리오데닌(Liriordenine) 등이다. 따라서, 상기 실시예들에 따른 연자육의 진통효과는 이들을 주요성분하여 가능할 것이다.

위 실시예 및 실험예들에서는 실험용 동물을 쥐로 하였으나, 다른 동물, 예를 들면 개나 원숭이 등일 수 있다. 따라서, 통증 동물모델도 쥐, 마우스 뿐만 아니라 다른 동물일 수 있다.

위 실시예에서 제제화 방법으로 추출물 제조만을 언급하였으나, 통상적으로 약제학적으로 허용되는 부형제와 함께 약제학적으로 허용되는 약학적 제제, 예를 들면 주사제, 액제, 시럽제, 정제, 캡슐제, 약침액 등으로 제제화하여 통증 억제 예방 및 치료를 위한 약학적 제제로 사용될 수 있다.

본 발명에 따른 약제학적 조성물은 입상적으로 투여시 경구, 복강, 피하 투여 등의 방법으로 투여할 수 있다.

본 발명에 따른 약제학적 조성물의 입상적 투여용량은 환자의 연령, 중상, 투여제형 또는 약물의 종류에 따라 다양하게 조절할 수 있다. 특정한 상태에서 바람직한 투여량을 결정하는 것은 공지된 기술에 해당한다.

4. 참고문헌

Abbott FV, Franklin KB, Ludwick RJ, and Melzack R. Apparent lack of tolerance in the formalin test suggests different mechanisms for morphine analgesia in different types of pain. *Pharmacol Biochem Behav* 15:637- 640, 1981.

Abbott FV, Melzack R, and Samuel C. Morphine analgesia in tail-flick and formalin pain tests is mediated by different neural systems. *Exp Neurol* 75:644- 651, 1982.

Abdel-Fattah AM, Matsumoto K, and Watanabe H. Antinociceptive effects of *Nigella sativa* oil and its major component, thymoquinone, in mice. *Eur J Pharmacol* 400:89- 97, 2000.

Alreja V, Mutualik P, Nayar U, and Manchanda SK. The formalin test: a tonic pain model in the primate. *Pain* 20:97- 104, 1984.

Brose and Cousins. Subcutaneous lidocaine for treatment of neuropathic cancer pain. *Pain* 45:145- 8, 1991.

Dubuisson D and Dennis SG. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain* 4:161- 174, 1977.

Hunskaar S and Hole K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain* 30:103- 114, 1987.

Leal LKAM, Ferreira AAG, Bezerra GA, Matos FJA, and Viana GSB. Antinociceptive, anti-inflammatory and bronchodilator activities of Brazilian medicinal plants containing coumarin: a comparative study. *J Ethnopharmacol* 70:151- 159, 2000.

Lee, B.H., Baik, E.J., Kim, E.J., Lee, S.H., and Moon, C.H. Development of behavioral signs of neuropathic pain following injury to distal sciatic nerve branches. *Neuroscience Abstracts*, p.119, 1996a.

Lee, B.H., Baik, E.J., Lee, S.H., and Moon, C.H. Injuries of different distal sciatic nerve branches differentially produce neuropathic pain in rats. *Abstracts - 8th World Congress on Pain*, p.27, 1996b.

Lee, B.H., Won, R., Baik, E.J., Lee, S.H., and Moon, C.H. An animal model of neuropathic pain employing injury to the sciatic nerve branches. *NeuroReport*, 11(4):657- 661, 2000a.

Lewis T and Kellgren JH. Observations relating to referred pain, visceromotor reflexes and other associated phenomena. *Clin Sci* 4:47- 71, 1939.

Melzack R and Melinkoff DF. Analgesia produced by brain stimulation: Evidence of a prolonged onset period. *Exp Neurol* 43:369- 374, 1974.

Mukherjee PK, Saha K, Balasubramanian R, Pal M, Saha BP. Studies on psychopharmacological effects of *Nelumbo nucifera* Gaertn. rhizome extract. *J Ethnopharmacol*. 1996 Nov;54(2-3):63- 7

Selye H. Further studies concerning the participation of the adrenal cortex in the pathogenesis of arthritis. *Br Med J*, 2:1129- 1135, 1949.

Tanelian and Cousins. Combined neurogenic and nociceptive pain in a patient with Pancoast tumor managed by epidural hydromorphone and oral carbamazepine. *Pain*. 1989 Jan;36(1):85- 8.

Ushimaru T, Kanematsu S, Katayama M, Tsuji H. Antioxidative enzymes in seedlings of *Nelumbo nucifera* germinated under water. *Physiol Plant*. 2001 May;112(1):39- 46.

Viana GSB, Vale TG, Pinho RSN, and Matos FJA. Antinociceptive effect of the essential oil from Cymbopogon citratus in mice. *J Ethnopharmacol* 70:323-327, 2000.

Winter CA. Anti-inflammatory testing methods: comparative evaluation of indomethacin and other agents. In : S. Gavattini and M.N.G. Dukes (Eds), *Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs*, Vol. 82, Excerpta Medica International Congress Series, Amsterdam, 1965, pp. 190-202.

발명의 효과

이상과 같이 본 발명에 의하면, 연자육의 유효한 진통효과를 검증하기 위해 사용되어지는 행동학적 지표인 신경병리성 통증(neuropathic pain) 모델과 포르말린 테스트(formalin test))를 이용한 동물모델을 제공하는 효과가 있다.

또한, 본 발명은, 행동학적 지표인 신경병리성 통증(neuropathic pain) 모델과 포르말린 테스트(formalin test))를 이용한 동물모델을 이용하여 연자육의 유효한 진통효과를 검증할 수 있는 효과가 있다.

이와 같이, 본 발명은, 우수한 진통효과를 보일 것으로 추정되는 연자육를 정제하여 추출한 후, 신경병리성 통증(neuropathic pain) 모델에서 기계적 및 냉각 이질통(mechanical and cold allodynia)에 대한 억제효과와 포르말린 테스트(formalin test))에서 직접적 자극에 대한 통증 및 염증성 반응에 의한 통증에 대한 억제 효과를 검사하는 등의 최근 진행되는 통증에 대한 여러 가지 지표에 대한 검사를 실시하여, 연자육의 우수한 진통억제 효과를 발견하였다.

본 발명은 신경병리성 통증 모델과 포르말린 테스트(formalin test)에서 연자육의 우수한 진통효과를 입증함으로써, 신경손상으로 통증을 느끼는 통증환자뿐만 아니라, 일반 통증질환에도 상기 약재의 이용을 통하여 통증 완화효과를 기대해볼 수 있을 것이다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

실험동물의 경골신경과 비복신경의 결찰 및 절단을 통해 신경병리성 통증후군을 유발할 수 있는 동물모델을 만든 다음, 이질통 검사를 실시하여 통증에 대한 연자육의 진통효과를 검증하는 연자육의 진통효과 검증방법.

청구항 2.

제1항에 있어서, 상기 이질통 검사는 폰 프레이 헤어(von-Frey hair)에 의한 기계적 이질통 검사와 아세톤(acetone)에 의한 냉각 이질통 검사 중 어느 하나인 것을 특징으로 하는 연자육의 진통효과 검증방법.

청구항 3.

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 신경병리성 통증은 관절염, 근육통, 만성통 중 어느 하나인 것을 특징으로 하는 연자육의 진통효과 검증방법.

청구항 4.

실험동물에 포르말린을 투여하여 실험동물에 직접적 자극을 가한 다음, 연자육의 통증에 대한 진통효과를 검증하는 연자육의 진통효과 검증방법.

청구항 5.

제4항에 있어서, 상기 통증은, 염증성 통증(inflammation pain)과 같은 지속성 통증(tonic pain)인 것을 특징으로 하는, 연자육의 진통효과 검증방법.

청구항 6.

진통효과 검증방법을 이용하여 진통효과가 검증된 연자육을 유효성분으로 하는 연자육 진통 제제.

청구항 7.

제6항에 있어서, 상기 진통효과 검증방법은, 상기 제1항 내지 제5항 중 어느 하나인 것을 특징으로 하는 연자육 진통 제제.

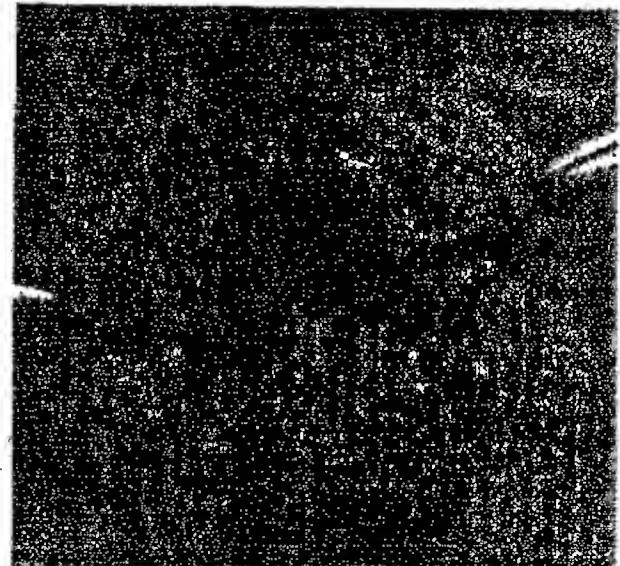
청구항 8.

제7항에 있어서, 상기 연자육의 주요성분은, 아노나인(Anonaine), 아시미로빈(Asimilobine)(R-form), 디하이드로뉴

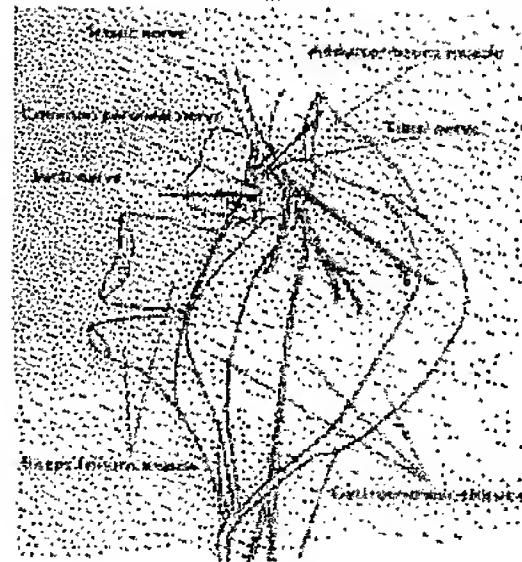
시페린(Dehydronuciferine), 디하이드로로에메린(Dehydroroemerine), 디하이드로아노나인(Dehydroanonneine), 디메틸코크라유린1- (p- 하이드록시벤질)- 6,7- 디하이드록시- 1,2,3,4- 테트라하이드로이소퀴놀린(Demethylcoclaurine-1- (p- Hydroxybenzyl)- 6,7- dihydroxy- 1,2,3,4- tetrahydroisoquinoline), 이소리엔시닌(Isoliensinine), 리엔시닌(Liensinine), 리리니딘(Lirinidine), 리리오데닌(Liriiodenine) 중 어느 하나 또는 하나 이상인 것을 특징으로 하는 연자용 진통 제제.

도면

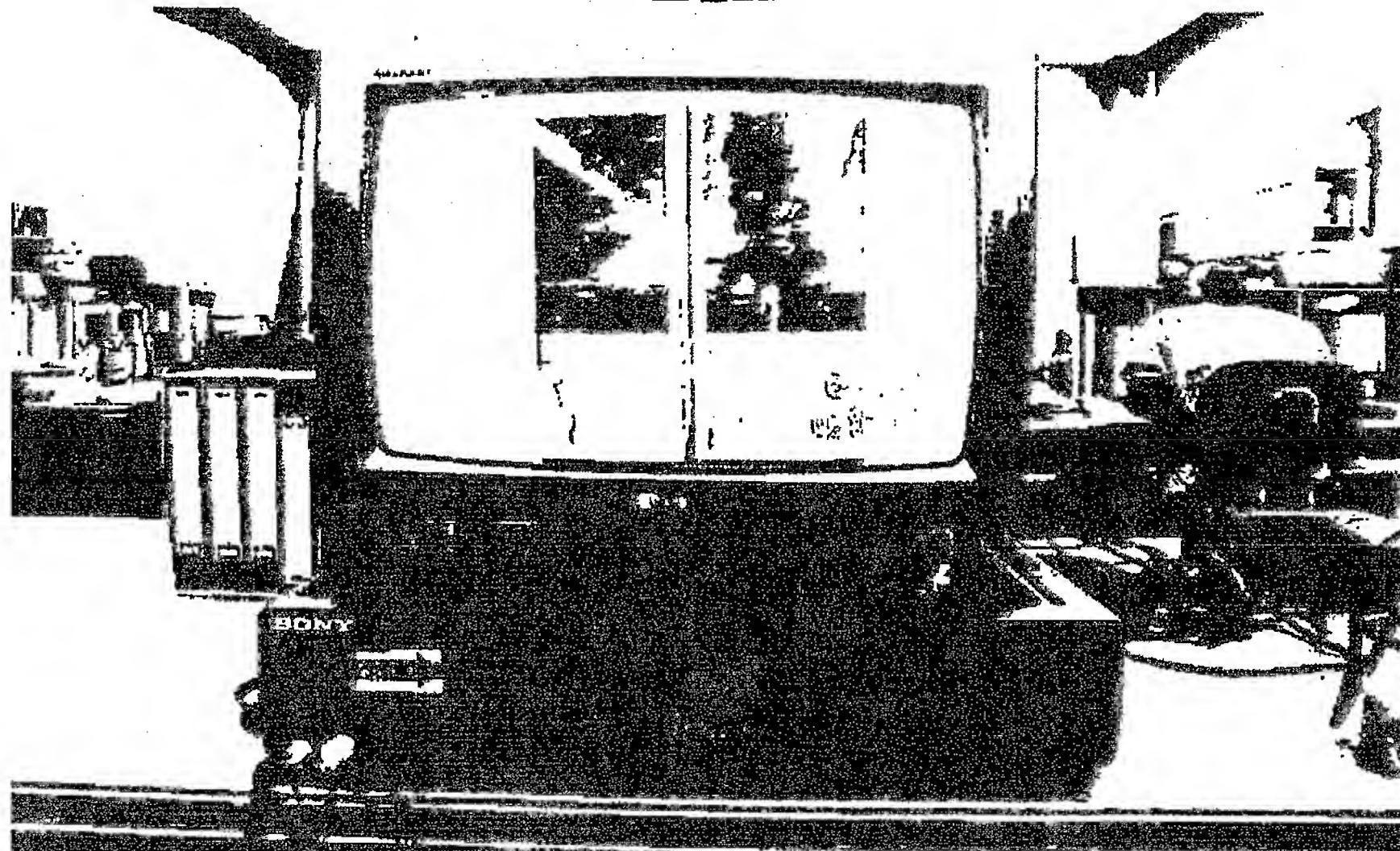
도면1a



도면1b



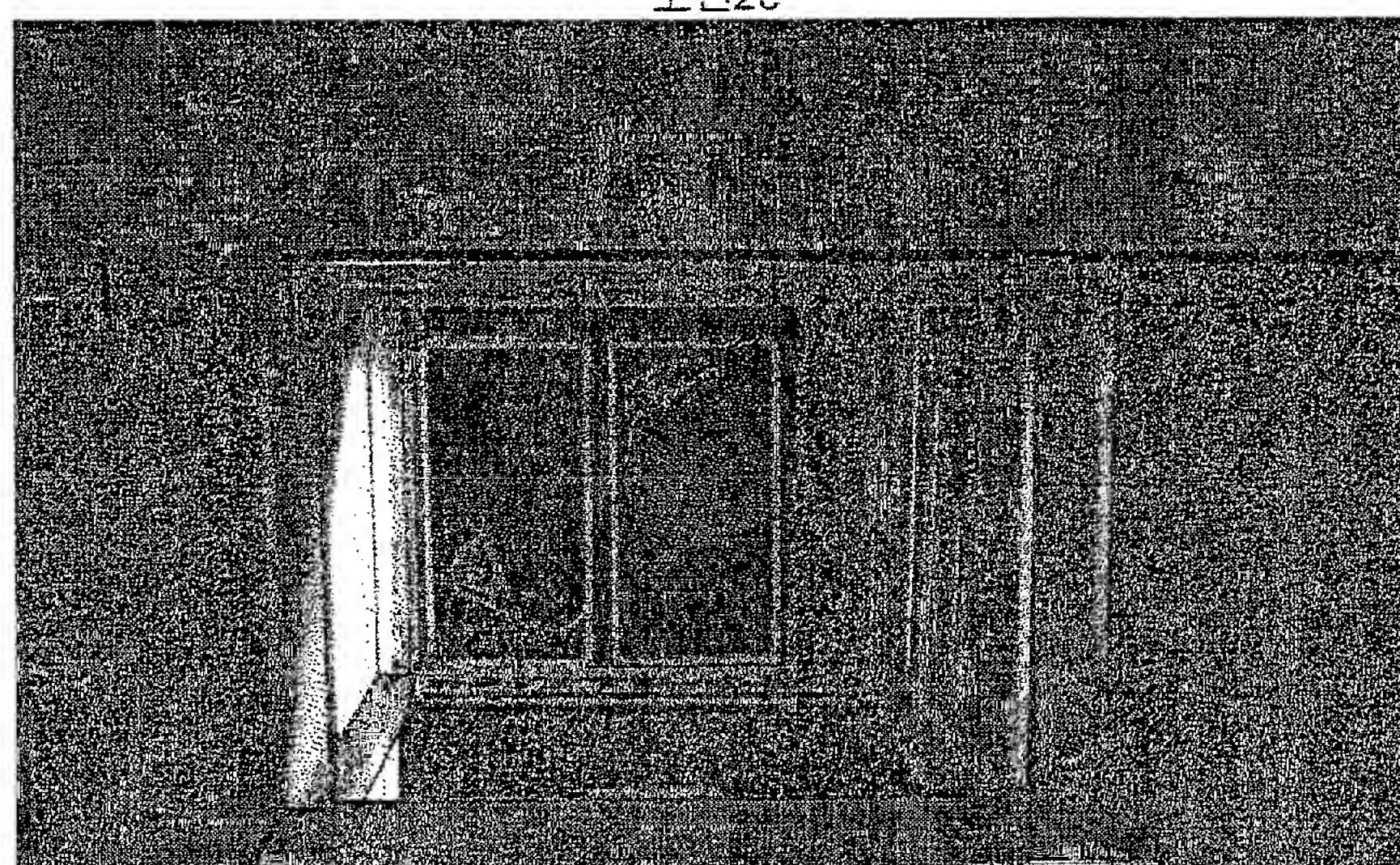
도면2a



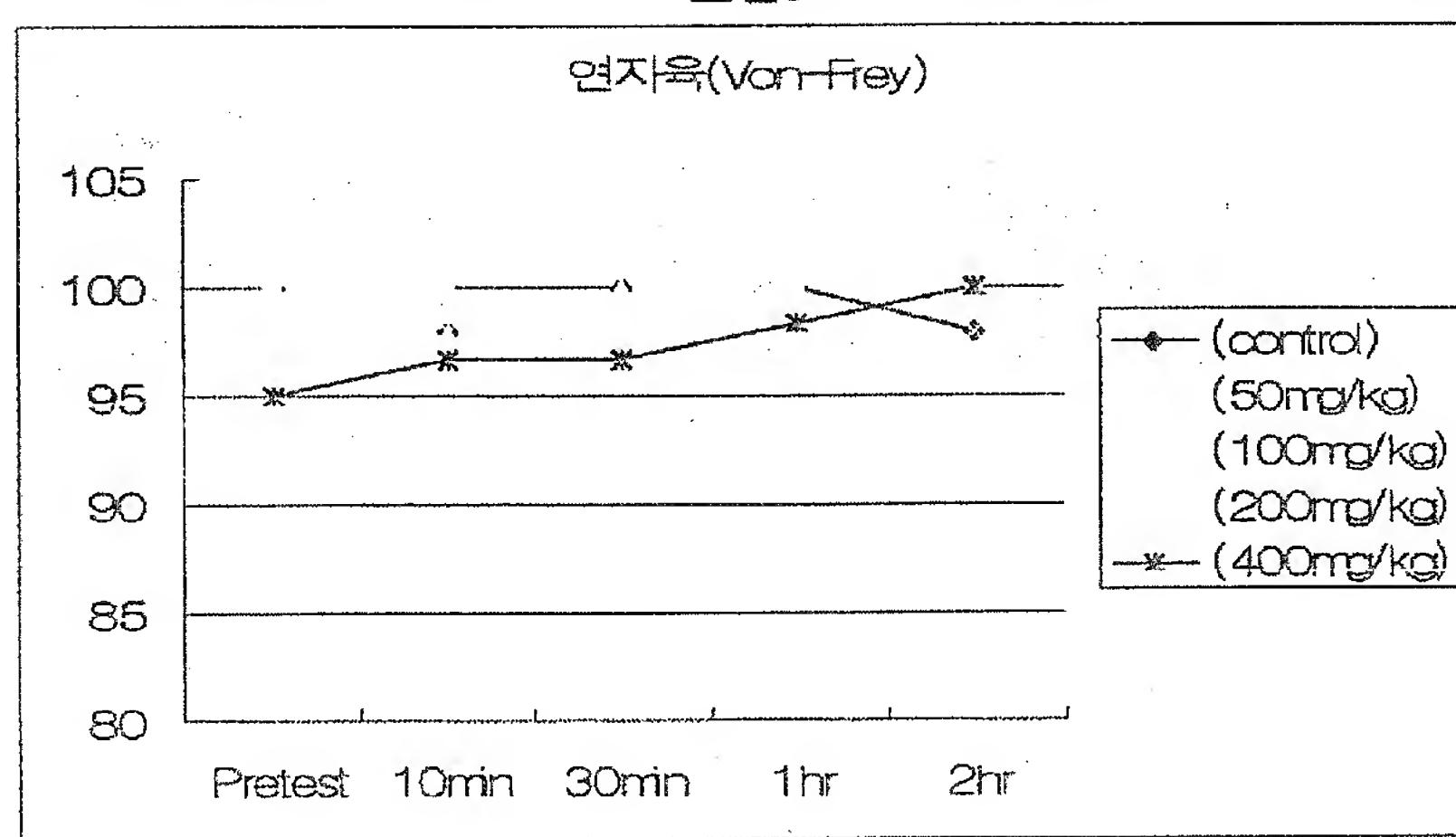
도면2b



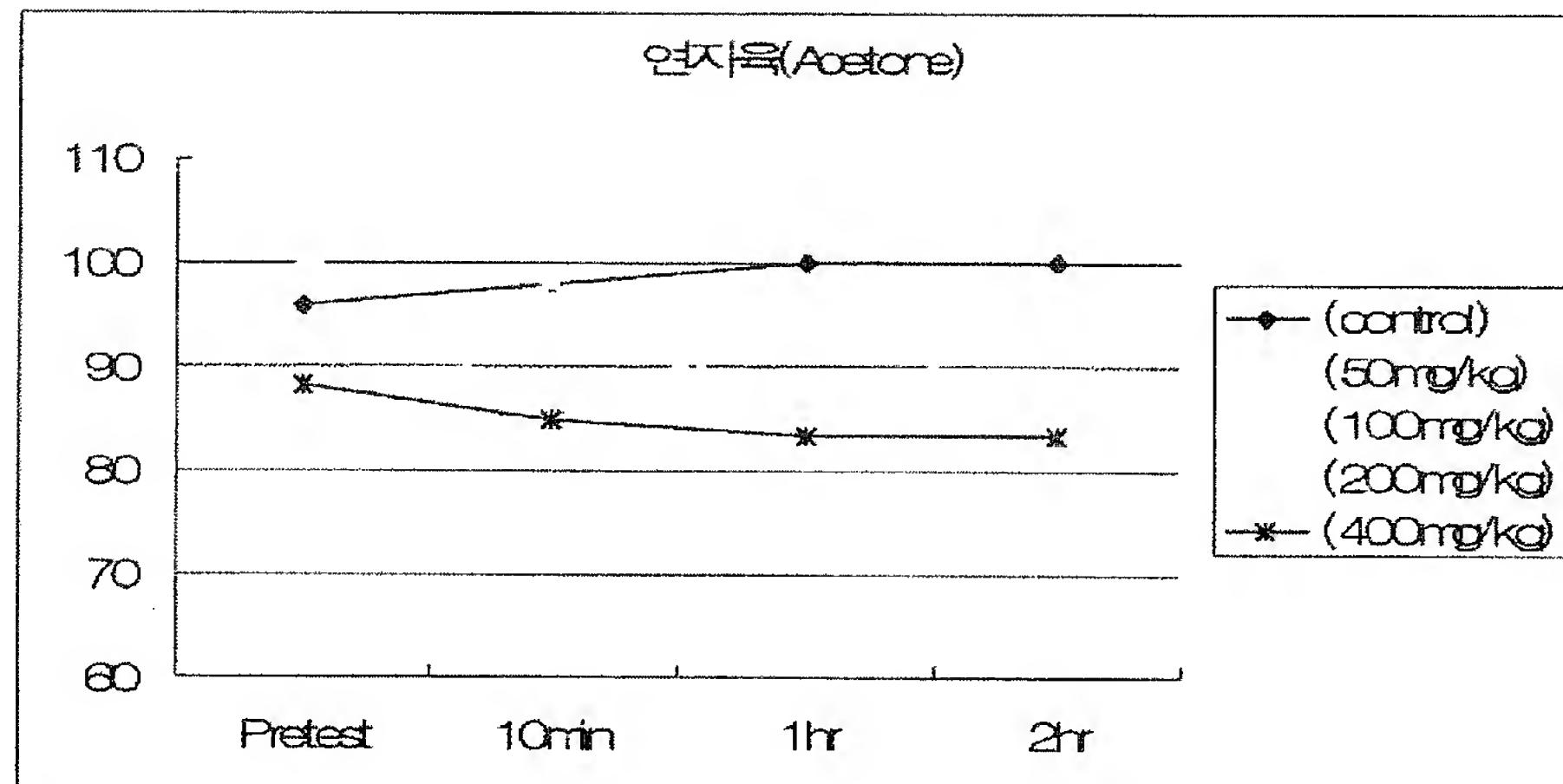
도면2c



도면3



도면4



도면5

